



Instituto de Biomedicina de Sevilla
Facultad de Medicina
Departamento de Fisiología Médica y Biofísica

TESIS DOCTORAL

Mecanismos moleculares de la sensibilidad aguda al
oxígeno en los quimiorreceptores arteriales: función del
complejo I mitocondrial

M^a Carmen Fernández-Agüera Rodríguez
Sevilla, 2015

El Dr. José López Barneo, Catedrático del Departamento de Fisiología Médica y Biofísica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla, y la Dra. Lin Gao Chen, Investigadora del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS)

CERTIFICAN:

que la presente tesis doctoral titulada “Mecanismos moleculares de la sensibilidad aguda al oxígeno en los quimiorreceptores arteriales: función del complejo I mitocondrial”, presentada por la doctoranda María del Carmen Fernández-Agüera Rodríguez, licenciada en Biología, ha sido realizada bajo su dirección y cumple con las condiciones exigidas para optar al grado de Doctora por la Universidad de Sevilla.

Sevilla, 27 de abril de 2015.



Fdo. Dr. José López Barneo



Fdo. Dra. Lin Gao Chen

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis directores de tesis, los Drs. José López Barneo y Lin Gao Chen, sus enseñanzas, su apoyo y su dedicación a este proyecto y a mi persona. El trabajo que se describe, realizado con metodologías muy diferentes, ha sido posible gracias a la participación fundamental de Patricia González Rodríguez (electrofisiología), Patricia Ortega Sáenz (amperometría), Alberto Pascual (bioquímica) y Óscar Pintado (generación de los ratones mutantes). Deseo también destacar la contribución de Antonio García-Pergañeda en las etapas iniciales de la generación de la construcción de ADN, y de Nacho Arias Mayenco y Paula García Flores por su excelente apoyo técnico. Esta tesis doctoral ha sido realizada gracias a una beca predoctoral del programa FPI del Ministerio de Economía y Competitividad y a ayudas de la Fundación Botín y el Plan Nacional al grupo de investigación.

*A Alberto,
a mi hermano
y en especial a mi madre*

ÍNDICE

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	3
1. El sistema homeostático sensor de oxígeno	4
2. Fisiología del cuerpo carotídeo	5
2.1. Estructura y función del cuerpo carotídeo	5
2.2. Fisiología de las células glómicas. Canales de K ⁺ regulados por el oxígeno	7
3. Mecanismos moleculares de la sensibilidad al oxígeno en las células glómicas	11
4. Aspectos generales de la función mitocondrial	18
4.1. El ciclo de Krebs y la cadena de transporte de electrones	18
4.2. Estructura del complejo I mitocondrial. Sitio de unión de la rotenona	20
OBJETIVOS	22
MATERIALES Y MÉTODOS	25
1. Generación de los ratones <i>knockout</i> condicionales para el gen de la subunidad Ndufs2 del complejo I mitocondrial	27
1.1. El sistema Cre/loxP	27
1.2. Clonación del gen <i>Ndufs2</i>	28
1.3. Generación del alelo condicional <i>Ndufs2</i>	29
1.4. Obtención de células madre embrionarias de ratón portadoras del alelo condicional <i>Ndufs2</i>	29
1.4.1. Cultivo de células madre embrionarias de ratón	29
1.4.2. Cultivo de células BRL	31
1.4.3. Generación de clones estables de células ES portadoras del alelo condicional <i>Ndufs2</i>	31
1.4.4. Genotipado de clones de células ES mediante <i>southern blot</i> ...	31
1.5. Generación de los ratones <i>knockout</i>	32
1.6. Mantenimiento y tratamiento de los modelos de ratón <i>knockout</i>	33
1.7. Genotipado de los modelos de ratón <i>knockout</i> condicionales	33
1.7.1. Comprobación del genotipo mediante <i>southern blot</i>	33
1.7.2. Genotipado rutinario mediante PCR	34
2. Medida de la función respiratoria mediante plestismografía	35

3. Técnicas de biología molecular y bioquímica	35
3.1. Análisis de la expresión génica mediante PCR cuantitativa	35
3.2. Análisis de proteínas mediante <i>western blot</i>	36
3.3. Análisis de proteínas mitocondriales mediante <i>blue native PAGE</i> y <i>western blot</i>	38
3.4. Medida del nivel de succinato	38
4. Técnicas histológicas	39
4.1. Inmunohistoquímica de fluorescencia en secciones de criostato	39
4.2. Inmunohistoquímica con peroxidasa en secciones de parafina	39
4.3. Cuantificación de volumen y número de células	40
5. Microscopía electrónica de transmisión	40
6. Actividad mitocondrial	41
6.1. Ensayo <i>in vitro</i> de la actividad de los complejos I y II mitocondriales	41
6.2. Medida del consumo de oxígeno dependiente de los complejos I y II mitocondriales	42
6.3. Medida del nivel de ATP	43
7. Cultivos primarios	44
7.1. Rodajas de cuerpo carotídeo	44
7.2. Células dispersas de cuerpo carotídeo	44
7.3. Rodajas de médula adrenal	44
8. Registro de la actividad secretora celular mediante amperometría	45
8.1. Dispositivo electrónico de amplificación y registro	46
8.2. Análisis de la señal amperométrica	47
9. Microfluorimetría	47
9.1. Medida de cambios en la concentración citosólica de Ca^{2+}	48
9.2. Medida de cambios en la concentración de NADH	48
9.3. Medida de la producción de especies reactivas de oxígeno en el espacio intermembrana mitocondrial	49
9.4. Equipamiento de registro	49
10. Registro de las corrientes iónicas y el potencial de membrana mediante la técnica de <i>patch-clamp</i>	49
10.1. Medida de las corrientes iónicas mediante <i>voltage-clamp</i>	50
10.2. Medida del potencial de membrana mediante <i>current-clamp</i>	51
10.3. Equipamiento de registro	51

11. Análisis estadístico de los datos	51
RESULTADOS	54
1. Generación de los modelos de ratón <i>knockout</i> condicionales para el gen de la subunidad Ndufs2 del complejo I mitocondrial	56
1.1. Construcción del alelo condicional <i>Ndufs2^{flox-frt}</i>	56
1.2. Obtención de células madre embrionarias de ratón portadoras del alelo condicional <i>Ndufs2^{flox-frt}</i>	56
1.3. Generación de las líneas de ratón <i>knockout</i> condicional TH-NDUFS2 y ESR-NDUFS2	57
2. Estudio de los ratones TH-NDUFS2	59
2.1. Estado general y desarrollo de los animales TH-NDUFS2	59
2.2. Estructura y niveles de ARNm y proteína Ndufs2 en el sistema simpatoadrenal	60
2.3. Niveles de ATP en órganos simpatoadrenales	65
2.4. Respuesta ventilatoria a la hipoxia	65
2.5. Propiedades funcionales de las células glómicas de animales controles y TH-NDUFS2	67
2.5.1. Respuesta secretora a la hipoxia	67
2.5.2. Cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelular	70
2.5.3. Características electrofisiológicas	71
2.5.3.1. Parámetros electrofisiológicos y corrientes iónicas	71
2.5.3.2. Regulación por hipoxia de las corrientes de K^{+}	74
3. Estudio de los ratones ESR-NDUFS2	78
3.1. Tratamiento y evolución de la línea ESR-NDUFS2	78
3.2. Niveles de ARNm y proteína Ndufs2	79
3.3. Análisis de la función mitocondrial	81
3.4. Respuesta ventilatoria a la hipoxia	83
3.5. Propiedades funcionales de las células glómicas de animales controles y ESR-NDUFS2	84
4. Efecto de la delección de la subunidad Ndufs2 sobre la respuesta secretora a la hipoxia en las células cromafines	86
5. Mecanismos reguladores de la respuesta a la hipoxia aguda	88
5.1. Ensamblaje del complejo I mitocondrial	89

5.2. Contenido de succinato del cuerpo carotídeo	90
5.3. Respuesta a hipoxia de células glómicas TH-NDUFS2 incubadas con succinato	91
5.4. Efecto de agentes redox en la respuesta a hipoxia de las células glómicas	93
5.5. Efecto del NADH en la regulación por hipoxia de la corriente de K ⁺ voltaje-dependiente	96
 DISCUSIÓN	 99
1. Pérdida selectiva de la respuesta a hipoxia en las células glómicas	101
2. El complejo I mitocondrial modula la actividad de los canales de K ⁺ durante la hipoxia	107
3. Modelo de señalización de la hipoxia aguda en los quimiorreceptores arteriales	109
 CONCLUSIONES	 113
BIBLIOGRAFÍA	118

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Inervación y estructura del cuerpo carotídeo	7
Figura 2. Respuesta a hipoxia de las células glómicas	10
Figura 3. Mecanismo de quimiotransducción del estímulo hipóxico	11
Figura 4. Efecto de los inhibidores mitocondriales sobre la respuesta a hipoxia de las células glómicas	17
Figura 5. Sensibilidad diferencial de las células glómicas a hipoxia e hipoglucemia	18
Figura 6. Ciclo de Krebs y fosforilación oxidativa	19
Figura 7. Estructura y sitio de unión de ubiquinona del complejo I mitocondrial	21
Figura 8. Deleción de un gen mediante el sistema Cre/loxP	27
Figura 9. Diseño experimental de la generación de los modelos de ratón <i>knockout</i> de la subunidad <i>Ndufs2</i> del complejo I mitocondrial	28
Figura 10. Plásmidos empleados en la generación del alelo condicional <i>Ndufs2</i>	30
Figura 11. Detección de catecolaminas mediante amperometría	45
Figura 12. Análisis de restricción de P49FRT	57
Figura 13. Esquema de los alelos <i>Ndufs2</i> y genotipado de ES y ratones TH- NDUFS2 mediante <i>southern blot</i> y PCR	58
Figura 14. Evolución del peso de los ratones TH-NDUFS2	60
Figura 15. Análisis de la expresión de <i>Ndufs2</i> y <i>Sdhd</i> en tejidos catecolaminérgicos del sistema nervioso periférico de ratones TH-NDUFS2 mediante PCR cuantitativa	61
Figura 16. Análisis de la expresión de la subunidad <i>Ndufs2</i> en tejidos catecolaminérgicos del sistema nervioso periférico de ratones TH- NDUFS2 mediante <i>western blot</i>	61
Figura 17. Análisis histológico del cuerpo carotídeo de los ratones TH-NDUFS2	62
Figura 18. Análisis histológico de la médula adrenal y el ganglio cervical superior de los ratones TH-NDUFS2	63
Figura 19. Estudio ultraestructural de las células glómicas TH-NDUFS2	64

Figura 20. Análisis de la cantidad de ATP en tejidos TH ⁺ del sistema nervioso periférico de los ratones TH-NDUFS2	65
Figura 21. Respuesta hiperventilatoria a hipoxia de ratones los TH-NDUFS2	66
Figura 22. Capacidad secretora de las células glómicas TH-NDUFS2	67
Figura 23. Respuesta secretora de las células glómicas de ratones controles y TH-NDUFS2 a hipoxia, hipoglucemia e hipercapnia	69
Figura 24. Aumento de la concentración de Ca ²⁺ intracelular de las células glómicas de ratones controles y TH-NDUFS2 en respuesta a hipoxia, hipoglucemia e hipercapnia	70
Figura 25. Corrientes de Na ⁺ , Ca ²⁺ y K ⁺ voltaje-dependientes de las células glómicas de ratones controles y TH-NDUFS2	73
Figura 26. Corrientes iónicas de las células glómicas de animales controles y TH-NDUFS2	74
Figura 27. Regulación de la corriente de K ⁺ voltaje-dependiente por hipoxia	75
Figura 28. Regulación de la corriente de K ⁺ por hipoxia e hipercapnia en células glómicas de animales controles y TH-NDUFS2	76
Figura 29. Figura 29. Regulación por hipoxia de la corriente <i>leakage</i> de K ⁺ en las células glómicas controles y TH-NDUFS2	77
Figura 30. Tratamiento y evolución de los ratones ESR-NDUFS2	78
Figura 31. Nivel de ARNm de <i>Ndufs2</i> y <i>Sdhb</i> en tejidos catecolaminérgicos del sistema nervioso periférico de los ratones ESR-NDUFS2	79
Figura 32. Análisis histológico de tejidos catecolaminérgicos del sistema nervioso periférico de los ratones ESR-NDUFS2	80
Figura 33. Nivel de ARNm y proteína en riñón y corazón de los ratones ESR-NDUFS2	81
Figura 34. Determinación de la actividad de los complejos I y II mitocondriales en riñón y corazón de los ratones ESR-NDUFS2	82
Figura 35. Determinación del consumo de oxígeno dependiente de los complejos I y II mitocondriales en el modelo ESR-NDUFS2	83
Figura 36. Respuesta hiperventilatoria en hipoxia de los ratones controles y ESR-NDUFS2	84
Figura 37. Respuesta secretora de las células glómicas de ratones controles y ESR-NDUFS2	85

Figura 38. Aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular de las células glómicas de ratones controles y ESR-NDUFS2	86
Figura 39. Respuesta secretora de las células cromafines de ratones controles y TH-NDUFS2	87
Figura 40. Respuesta secretora de las células cromafines de ratones controles y ESR-NDUFS2	88
Figura 41. Análisis del ensamblaje de los complejos mitocondriales	90
Figura 42. Contenido de succinato del cuerpo carotídeo, cerebro y médula adrenal de ratas	91
Figura 43. Caracterización de la respuesta a hipoxia en células glómicas tratadas con succinato	92
Figura 44. Efecto de la N-acetilcisteína sobre las células glómicas TH-NDUFS2	94
Figura 45. Efecto del H_2O_2 sobre las células glómicas controles	95
Figura 46. Señalización de la hipoxia mediante especies reactivas de oxígeno	96
Figura 47. Efecto de la hipoxia en los niveles de NADH de las células glómicas de ratones controles y TH-NDUFS2TH-NDUFS2	97
Figura 48. Efecto del NADH sobre la corriente voltaje-dependiente	98
Figura 49. Modelo de sensibilidad a la hipoxia aguda en los quimiorreceptores arteriales	110
Figura 50. Funcionamiento directo y reverso del complejo I mitocondrial	111

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros electrofisiológicos de células glómicas de ratón	8
Tabla 2. Secuencia de los cebadores empleados para el genotipado de los ratones por PCR	34
Tabla 3. Anticuerpos utilizados para la detección de proteínas mediante <i>western blot</i> e inmunohistoquímica	37
Tabla 4. Soluciones de registro (I)	46
Tabla 5. Soluciones de registro (II)	53
Tabla 6. Comparación de parámetros electrofisiológicos de las células glómicas controles y TH-NDUFS2	72

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico	GFAP	<i>glial acidic fibrillary protein</i>
ADNc	ADN complementario	HIF	factor inducible por hipoxia
AMP	adenosín monofasto	HO-2	hemo oxigenasa 2
AMPK	proteín quinasa activada por AMP	Hpx	hipoxia
ARN	ácido ribonucleico	KO	<i>Knockout</i>
ARNm	ARN mensajero	MA	médula adrenal
ATP	adenosín trifosfato	MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina,
CC	cuerpo carotídeo	NAC	N-acteíl-cisteína
CMI	complejo mitocondrial I	NADH	dinucleótido de nicotinamida y adenina
CMII	complejo mitocondrial II	NAPDH	dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato
CMIII	complejo mitocondrial III	NeoR	gen de resistencia a neomicina
CMIV	complejo mitocondrial IV	PCR	reacción en cadena de la polimerasa
CTE	cadena de transporte de electrones	PHD	prolil-hidroxilasa
DCPIP	2,6-diclorofenol-indofenol	ROS	<i>reactive oxygen species</i>
DTT	ditiotreitól	RVH	respuesta ventilatoria a la hipoxia
ES	células madre embrionarias de ratón	SNP	sistema nervioso periférico
EPO	eritropoyetina	TH	tirosina hidroxilasa
FADH₂	flavín adenín dinucleótido	THB	ter-butil-hidroperóxido
FMN	flavín mononucleótido	TMX	tamoxifeno
GCS	Ganglio cervical superior	TTFA	tenoil-trifluoro-acetona
GDNF	<i>glial cell line-derived neurotrophic factor</i>	VPH	vasoconstricción pulmonar hipóxica

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

El oxígeno (O_2) es una molécula esencial para la vida de los animales debido a su metabolismo celular aeróbico, ya que la energía necesaria para realizar las funciones vitales la obtienen, principalmente, de la mitocondria mediante la fosforilación oxidativa; un proceso que requiere O_2 como aceptor final de electrones. La falta de O_2 , aunque sólo sea de manera focalizada y transitoria, puede dañar gravemente los tejidos. A lo largo de la evolución, los seres vivos, particularmente los mamíferos, han desarrollado mecanismos para adaptar la función del organismo tanto a situaciones de hipoxia aguda, para asegurar rápidamente el suministro de O_2 a órganos vitales, como a situaciones en las que la disminución de la presión parcial de O_2 (PO_2) en sangre se mantiene en el tiempo (hipoxia crónica). Esta última condición se da en millones de individuos que viven a gran altura o que sufren patologías respiratorias que dificultan el intercambio gaseoso entre la sangre y los alveolos (Lopez-Barneo et al., 2001).

Los mecanismos de adaptación a la hipoxia crónica requieren para instaurarse un rango temporal de horas o días y dependen de los factores de transcripción inducibles por hipoxia (*hypoxia inducible factors*, HIFs) compuestos por dos subunidades: HIF α (de la que existen 3 isoformas, 1,2, y 3) y HIF β . En situaciones con buen suministro de O_2 , las subunidades HIF α y HIF β no se ensamblan ya que unas enzimas de la familia de las dioxigenasas, denominadas prolil-hidroxilasas (PHD), hidroxilan a las subunidades HIF α . HIF α hidroxilado es reconocido por la proteína von Hippel-Lindau, que forma parte de un complejo ubiquitina ligasa que lo marca para su degradación en el proteasoma. Las PHDs, principales reguladoras de HIF, emplean el O_2 como sustrato y, por ello, su actividad se inhibe en hipoxia, lo cual implica que HIF α no se degrada sino que se ensambla con HIF β y se transloca al núcleo, dónde actúa regulando la expresión de genes implicados en la glucólisis. De este modo se induce en las células la transición de un metabolismo fundamentalmente oxidativo a un metabolismo glucolítico anaeróbico, para asegurar la generación de ATP. Además de favorecer la glucólisis, la estabilización y dimerización de HIF activa una amplia cohorte de genes que regulan procesos, como por ejemplo la angiogénesis y la eritrocitosis, que

contribuyen a compensar la escasez de O_2 (Ratcliffe, 2013; Semenza, 2012).

La adaptación a la hipoxia aguda depende de reflejos respiratorios y cardiovasculares rápidos, tales como la hiperventilación o la activación simpática, que en pocos segundos, incrementan la captación de O_2 del ambiente y aceleran la distribución del mismo a los tejidos, especialmente cerebro y corazón, por el sistema circulatorio.

1. El sistema homeostático sensor de oxígeno

Las respuestas adaptativas a la hipoxia aguda dependen de un conjunto de órganos que forman el sistema homeostático sensor de O_2 y que contienen células neurosecretoras o musculares lisas que son “sensoras de O_2 ”. Éstas células presentan una actividad tónica baja en normoxia ($PO_2 \sim 90$ -100 mmHg) y se activan (secretan transmisores o se contraen) en respuesta a hipoxia ($PO_2 < 60$ mmHg). Entre los órganos sensibles a O_2 destacan la arteria pulmonar, los cuerpos neuroepiteliales del pulmón, la médula adrenal (MA) y los quimiorreceptores arteriales (cuerpos carotídeos y aórticos) (Weir et al., 2005).

Las células de músculo liso de la arteria pulmonar son capaces de detectar variaciones en la PO_2 y contraerse en condiciones de hipoxia. Este fenómeno se denomina vasoconstricción pulmonar hipóxica (VPH) y es responsable de desviar el flujo sanguíneo desde las zonas del pulmón con baja tensión de O_2 hacia las de mayor PO_2 . De esta forma, se ventilan preferentemente las zonas mejor perfundidas. La VPH es característica de las arterias pulmonares ya que en las arterias sistémicas, la hipoxia produce vasodilatación para favorecer el aporte de O_2 a los tejidos (Franco-Obregon and Lopez-Barneo, 1996; Weir and Archer, 1995). Los cuerpos neuroepiteliales están compuestos por grupos de células neuroendocrinas situados en el epitelio de los bronquiolos. Se piensa que su función está relacionada con la distribución del flujo sanguíneo local ya que liberan neurotransmisores que modulan localmente el diámetro de los vasos sanguíneos. Los cuerpos neuroepiteliales están inervados por fibras mediante las que se comunican con el sistema nervioso central y contribuyen al control de la respiración a nivel sistémico (Jonz and Nurse, 2012). La MA está compuesta por células neurosecretoras, denominadas células cromafines, que actúan como

quimiosensores polimodales (Livermore et al., 2011; Munoz-Cabello et al., 2005). Se ha descrito que la sensibilidad a hipoxia de las células cromafines es un proceso no neurogénico que aparece en neonatos y desaparece posnatalmente una vez que madura la inervación esplácnica de la médula adrenal (Nurse et al., 2009; Thompson et al., 1997) . Sin embargo, la sensibilidad a hipoxia persiste en animales adultos, aunque el porcentaje de células cromafines sensibles es menor y la respuesta secretora desencadenada es menos potente que en neonatos (Munoz-Cabello et al., 2005).

Dentro del sistema homeostático sensor de O_2 destacan los quimiorreceptores arteriales localizados junto a las arterias aórtica y carótida. Los cuerpos aórticos son estructuras paraganglionares que se distribuyen de forma irregular por las ramas derivadas del nervio vago; están en torno a los arcos aórticos, cerca de las arterias carótida y subclavia. Cada cuerpo aórtico está formado por un conjunto de 5-50 células excitables, rodeadas de células sustentaculares (Jonz and Nurse, 2012). Los quimiorreceptores más importantes en mamíferos superiores y el hombre son los cuerpos carotídeos (CC), localizados en la bifurcación carotídea, y de ellos dependen los reflejos respiratorios (respuesta ventilatoria a hipoxia; RVH) y cardiovasculares (incremento del gasto cardiaco) necesarios para la adaptación aguda a la hipoxia (Livermore et al., 2011; Lopez-Barneo et al., 2001).

2. Fisiología del cuerpo carotídeo

2.1. Estructura y función del cuerpo carotídeo

El CC es el principal quimiorreceptor periférico y su función como sensor de O_2 se conoce desde el primer tercio del siglo XX (de Castro, 1928; Heymans, 1930). Este órgano sensorial no sólo detecta cambios en la PO_2 , sino que es un quimiorreceptor polimodal ya que también se activa por otros estímulos como la hipercapnia y la acidosis (Eyzaguirre and Koyano, 1965) o la hipoglucemia (Fitzgerald et al., 2009; Garcia-Fernandez et al., 2007; Pardal and Lopez-Barneo, 2002). El CC es un órgano par situado en las bifurcaciones de las arterias carótidas; está altamente irrigado, ya que dispone de abundantes vasos sanguíneos entretejidos en su parénquima, y tiene una alta tasa de consumo de O_2 (De Burgh Daly et al., 1954; Starlinger and Lubbers, 1976).

Recibe inervación aferente del ganglio petroso a través del nervio del seno carotídeo, que es una rama del nervio glosofaríngeo o IX par craneal, e inervación eferente compuesta fundamentalmente de fibras simpáticas posganglionares del ganglio cervical superior (GCS) (Figura 1A) (Fidone, 1986). El CC deriva embriológicamente de la cresta neural (Jiang et al., 2000; Le Douarin, 1986; Pardal et al., 2007) y está constituido principalmente por dos tipos de células (tipo I y II) que se organizan en grupos denominados glomérulos (Figura 1B).

Las células tipo I o glómicas son de tipo neuronal, tienen una forma más o menos esférica, de unos 10 μm de diámetro, y son las más numerosas en el CC (Lopez-Barneo et al., 2009). Su principal característica es la abundante presencia en su citoplasma de mitocondrias y vesículas de centro denso que contienen neurotransmisores, fundamentalmente ATP, acetilcolina, dopamina y varios neuropéptidos (Nurse and Piskuric, 2013). De hecho, las células tipo I son altamente dopaminérgicas y poseen una elevada expresión de la enzima tirosina hidroxilasa (TH), lo cual las hace fácilmente identificables en microscopía marcándolas con un anticuerpo frente a la TH. Las células glómicas son los elementos sensores de O_2 del CC (ver más adelante) y establecen uniones sinápticas con terminaciones nerviosas aferentes (“sinapsis quimiosensora”) que terminan en el centro respiratorio y otras estructuras centrales (de Castro, 1926, 1928; de Castro, 1940; Eyzaguirre and Uchizono, 1961). Otra característica principal de las células glómicas es que son productoras del factor neurotrófico GDNF (*glial cell line-derived neurotrophic factor*), que promueve la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas y que ha llevado a realizar ensayos empleando el CC en terapia celular aplicada a la enfermedad de Parkinson (Minguez-Castellanos et al., 2007; Toledo-Aral et al., 2003; Villadiego et al., 2005).

Las células tipo II o sustentaculares son de tipo glial. Son más pequeñas y alargadas que las células tipo I, y se localizan en la periferia de los glomérulos rodeando a las células tipo I con sus elongaciones citoplásmicas. Las células tipo II expresan marcadores de células gliales como la GFAP (*glial acidic fibrillary protein*) por lo que tradicionalmente se ha pensado que su función era meramente de soporte de las células tipo I. Sin embargo, recientemente se ha descrito que las células tipo II son células madre del

sistema nervioso periférico (SNP) que contribuyen al crecimiento del CC en condiciones de hipoxia crónica (Pardal et al., 2007). Esta hipertrofia del CC constituye una respuesta homeostática necesaria para aclimatar al organismo a la condición de hipoxemia y está mediada por las células tipo I, que detectan la escasez de O_2 y señalizan y activan a las células tipo II para estimular su proliferación. La comunicación entre las células tipo I y tipo II se produce mediante “sinapsis quimioproliferativas” que son fundamentales para la adaptación a la hipoxia crónica (Platero-Luengo et al., 2014).

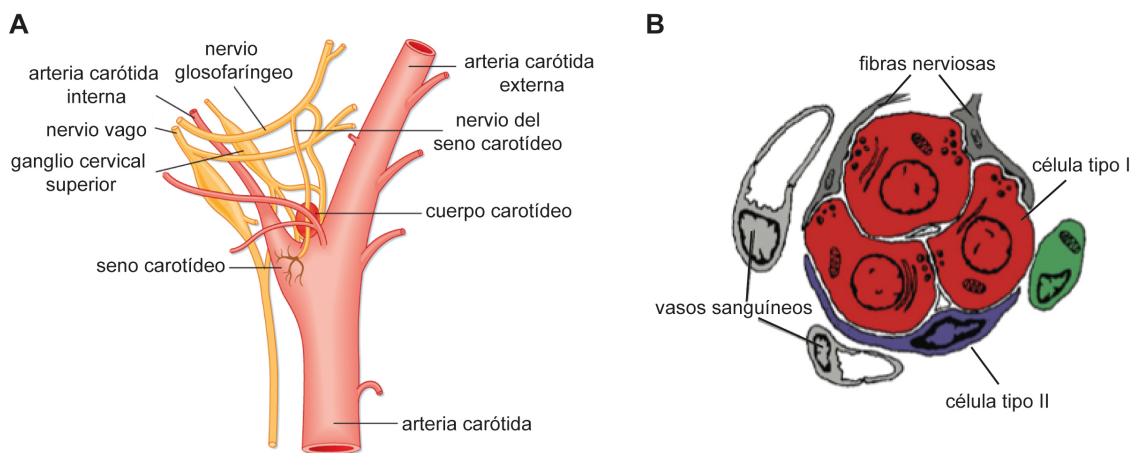


Figura 1. Inervación y estructura del cuerpo carotídeo.

(A) Esquema de la inervación aferente y eferente del CC. (B) Tipos celulares del cuerpo carotídeo. A: modificado de Koeppen & Stanton; *Berne and Levy Physiology*, 6ª edición. B: modificado de Pardal et al., 2007.

2.2. Fisiología de las células glómicas. Canales de K^+ regulados por el oxígeno

Las células glómicas, o tipo I, son elementos neurosecretores que al detectar una disminución de la PO_2 , u otros estímulos, liberan neurotransmisores por exocitosis, lo que a su vez activa fibras nerviosas que estimulan a los centros respiratorios o vegetativos del tronco del encéfalo. Esta función sensorial de las células glómicas se debe a que son excitables, ya que poseen canales voltaje-dependientes de Na^+ , Ca^{2+} y K^+ (Duchen et al., 1988; Lopez-Barneo et al., 1988; Urena et al., 1989), y a que la actividad de varios tipos de canales iónicos se modula por las variables físico-químicas de la sangre mencionadas anteriormente. La presencia de canales voltaje-

dependientes determina que cuando las células glómicas se despolarizan se produzca entrada de Ca^{2+} extracelular y la liberación de vesículas secretoras (Buckler and Turner, 2013; Urena et al., 1994). Además de las familias clásicas de canales voltaje-dependientes, las células glómicas poseen otros tipos de canales regulados por ligandos o de tipo *leakage* que participan en las respuestas secretoras a los diferentes estímulos (Buckler, 1997; Garcia-Fernandez et al., 2007; Hescheler et al., 1989). Las subfamilias de canales iónicos que se expresan en las células glómicas pueden diferir entre especies y, dentro de la misma especie, en las diferentes etapas del desarrollo del animal (Lopez-Lopez et al., 2007). Las principales características electrofisiológicas de las células tipo I de ratón, la especie más utilizada en esta tesis doctoral, se recogen en la tabla 1 (Ortega-Saenz et al., 2010).

Tabla 1. Parámetros electrofisiológicos de células glómicas de ratón.

Parámetro	Valor
Capacidad celular (pF)	$2,9 \pm 0,1$
Resistencia de entrada (GOhm)	$7,8 \pm 0,9$
Potencial de membrana (mV)	$-57,0 \pm 1,2$
Densidad de corriente (-20 mV, pH8,2, pA/pF)	$7,9 \pm 2,7$
Corriente de K^+ (+30 mV, pA/pF)	362 ± 17
Corriente de Na^+ (+10 mV, pA/pF)	$26,2 \pm 5,0$
Corriente de Ca^{2+} (+20 mV, pA/pF)	$-7,5 \pm 0,9$

Modificado de Ortega-Sáenz *et al*, 2010.

El proceso de quimiotransducción en respuesta a la hipoxia se basa en la despolarización de las células glómicas como consecuencia de la inhibición de canales de K^+ por la disminución de la PO_2 (Lopez-Barneo et al., 1988; Lopez-Lopez et al., 1989; Lopez-Lopez et al., 2007). En estas células se han

descrito 3 poblaciones principales de canales de K^+ : Kv, dependientes de Ca^{2+} y *background* o *leakage*. Los canales Kv son una familia bien conocida y heterogénea de canales voltaje-dependientes que varían entre sí fundamentalmente en el umbral de activación y en la cinética de inactivación. Los canales Kv fueron los primeros sensibles a cambios de la PO_2 que se describieron en el CC (Lopez-Barneo et al., 1988) (Figura 2A). Inicialmente se pensó que el canal de K^+ inhibido por la hipoxia podría ser un subtipo específico, pero análisis posteriores han demostrado que en diferentes especies existen varias subfamilias de canales Kv regulados por el O_2 (Ganforina and Lopez-Barneo, 1992; Lopez-Lopez et al., 2003; Patel and Honore, 2001; Perez-Garcia et al., 2004). Algunos laboratorios han descrito que la corriente voltaje-dependiente regulada por la hipoxia está medida fundamentalmente por canales de K^+ activados por Ca^{2+} (Lopez-Lopez et al., 1997; Peers, 1990a). Dentro de estos canales los mejor estudiados en las células glómicas son los maxi-K de gran conductancia. Los registros de canal maxi-K únicos realizados por diferentes laboratorios han dado resultados contradictorios en lo que concierne a su sensibilidad a la hipoxia (Ganforina and Lopez-Barneo, 1992; Wyatt et al., 1995). En rodajas del CC la aplicación de iberitoxina, un bloqueante selectivo de los canales maxi-K, produce despolarización (Wyatt et al., 1995) y actividad secretora (Ortega-Saenz et al., 2006; Pardal et al., 2000) lo que sugiere que estos canales contribuyen al potencial de reposo de las células. No obstante, la respuesta a hipoxia no se inhibe tras el bloqueo farmacológico de los canales maxi-K (Ortega-Saenz et al., 2006). Por último, existen en las células glómicas canales *leakage*, reguladores del potencial de membrana que se inhiben por hipoxia (Buckler, 1997; Hescheler et al., 1989) aunque se desconoce la naturaleza de los mismos y si pertenecen a una o varias subfamilias moleculares. Algunos autores han propuesto que los canales *leakage* pertenecen a la familia molecular TASK1/3 (Buckler et al., 2000; Kim et al., 2009), sin embargo, los ratones genéticamente modificados con delección de los genes *task1* y *task3* mantienen una respuesta secretora a la hipoxia prácticamente normal (Ortega-Saenz et al., 2010). Por lo tanto, las células glómicas expresan una amplia variedad de canales de K^+ y parece que no existe entre ellos un canal específico que se regule por la hipoxia. Por el contrario, los datos

experimentales sugieren que diferentes canales de K^+ *leakage* y voltaje-dependientes, que se compensan unos a otros, contribuyen a la respuesta a la hipoxia en las células glómicas.

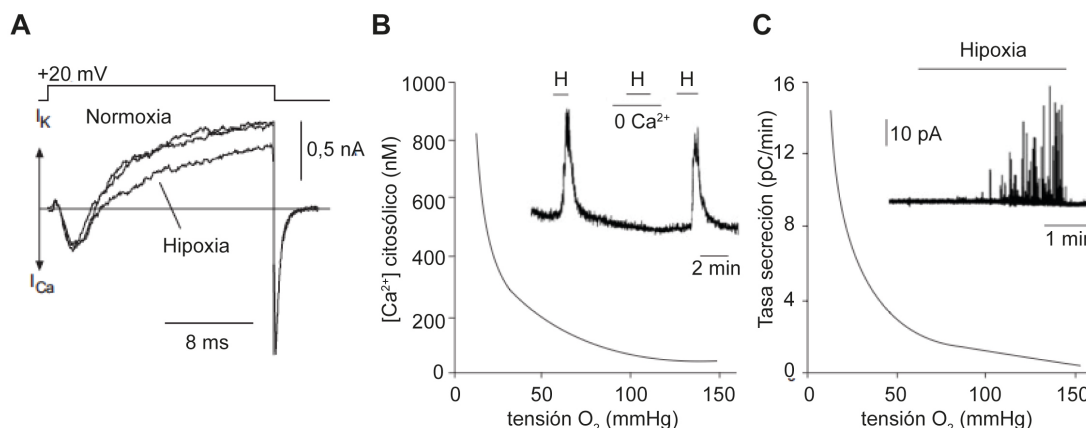


Figura 2. Respuesta a hipoxia de las células glómicas.

(A) Registro de las corrientes iónicas voltaje-dependientes de Ca^{2+} (I_{Ca}) y K^+ (I_K) de células glómicas de conejo mediante la técnica de *patch clamp*. Se muestra la inhibición reversible de la corriente de K^+ en hipoxia. (B) Cambios en la concentración de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) citosólico en función de la tensión de O_2 . El registro de microfluorimetría muestra que el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ citosólico es dependiente del Ca^{2+} extracelular. (C) Tasa de secreción de catecolaminas en función de la tensión de O_2 . Se ilustra con la respuesta secretora a hipoxia en un registro de amperometría. Modificado de López-Barneo *et al.*, 2008

A pesar de la variabilidad de canales iónicos que existen en las células glómicas y de los cambios entre especies, una gran cantidad de datos experimentales han confirmado que el mecanismo de quimiotransducción de la hipoxia depende de la inhibición de la conductancia al K^+ causada por este estímulo. Esto resulta en un incremento de la resistencia de entrada de la membrana plasmática y en la despolarización celular. La despolarización a su vez conlleva la apertura de canales de Ca^{2+} (y Na^+ en algunas células glómicas), entrada de Ca^{2+} desde el medio externo (Figura 2B) y secreción cuántica de neurotransmisores (Figura 2C) (Buckler and Vaughan-Jones, 1994; Urena *et al.*, 1994). Los neurotransmisores activan a los terminales nerviosos de las fibras aferentes del nervio del seno carotídeo que conducen la información quimiosensora hasta los centros respiratorios del tronco del encéfalo. Actualmente, existe un amplio consenso en torno a este modelo de quimiotransducción basado en la regulación de canales de K^+ por O_2 (Figura 3).

Además de en el CC, los canales de K^+ regulados por la hipoxia se han descrito en otras células quimiosensoras del sistema homeostático sensor de O_2 , tales como los miocitos pulmonares (Post et al., 1992), las células cromafines (Thompson et al., 1997), o las células de los órganos neuroepiteliales (O'Kelly et al., 1999).

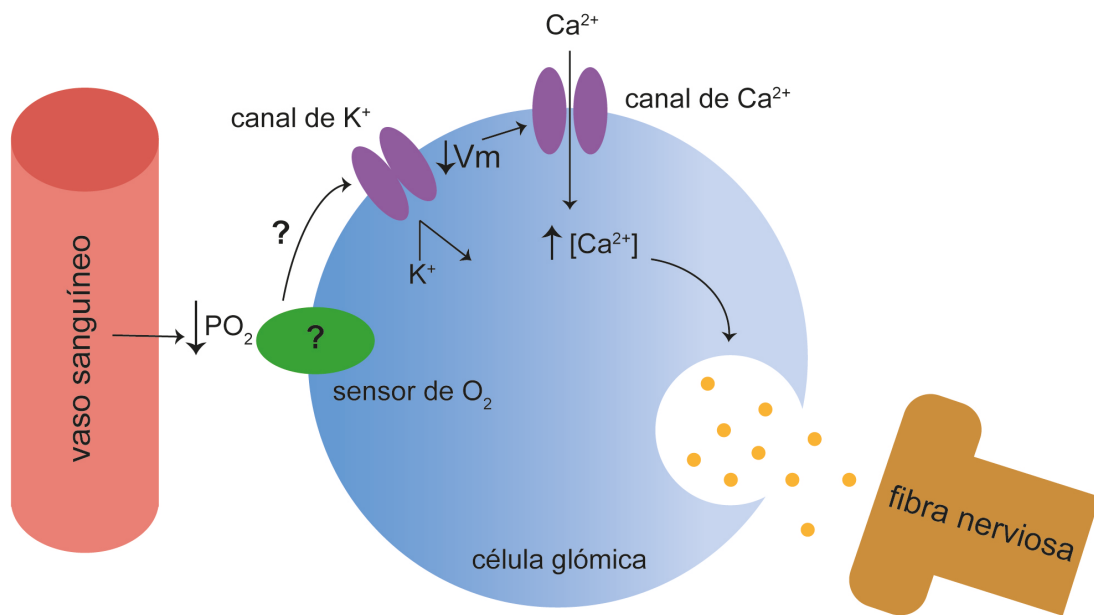


Figura 3. Mecanismo de quimiotransducción del estímulo hipóxico.

Modificado de López-Barneo *et al.*, 2003.

3. Mecanismos moleculares de la sensibilidad al oxígeno en las células glómicas

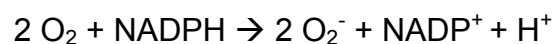
Una vez establecidas las características electrofisiológicas de las células glómicas y otras células quimiosensoras, la investigación en el campo de la hipoxia aguda se ha centrado en desvelar el mecanismo “sensor de O_2 ” e identificar las moléculas capaces de detectar en pocos segundos la bajada de la PO_2 en el ambiente y modificar, de forma directa o indirecta, la actividad de los canales de K^+ . Se han propuesto diversas hipótesis sobre la naturaleza de estos sensores pero ninguna de ellas ha podido ser confirmada de forma inequívoca ya que los experimentos para desentrañar la naturaleza del mecanismo sensor de O_2 se ven dificultados por diversos factores. Por un lado, el pequeño tamaño del órgano limita en gran medida la posibilidad de llevar a

cabo experimentos de biología molecular y bioquímica. Por otro lado, los experimentos funcionales que pueden realizarse en células dispersas requieren una vigorosa digestión enzimática y mecánica que, en ocasiones, causa la pérdida de sensibilidad a hipoxia. Además, es difícil controlar y monitorizar un estímulo gaseoso como el O_2 (Lopez-Barneo et al., 2009). En algunos casos, el uso de ratones *knockout* (KO) de los genes que codifican algunas proteínas propuestas como “sensores” han demostrado que éstos no eran necesarios para el mantenimiento de la respuesta a la hipoxia por las células quimiosensoras (Adachi et al., 2004; Fu et al., 2000; Ortega-Saenz et al., 2006; Thompson et al., 2002). A continuación, se describen de forma breve los mecanismos más relevantes que se han postulado como sensores de O_2 .

Uno de los candidatos clásicos para actuar como “sensor de O_2 ” en las células glómicas es la mitocondria (ver “apartado 4”) debido a la exquisita sensibilidad del CC a los inhibidores de la cadena de transporte de electrones (CTE) o desacoplates de la fosforilación oxidativa (Mills and Jobsis, 1970). En la mayoría de las células el flujo de electrones a través de la CTE no se inhibe hasta que se alcanzan niveles de PO_2 cercanos a la anoxia ($PO_2 \sim 1-2$ mmHg) ya que la citocromo c oxidasa o complejo IV mitocondrial (CMIV) tiene una alta afinidad por el O_2 . Inicialmente se pensó que las células glómicas podrían tener una citocromo c oxidasa con menor afinidad por el O_2 de lo normal y, de ese modo, en condiciones “fisiológicas” de hipoxia se produciría una inhibición mitocondrial que podría tener un papel quimiosensor. En una serie de elegantes experimentos, Biscoe y Duchon (Duchon and Biscoe, 1992a, b) mostraron que diferentes parámetros mitocondriales en las células glómicas (niveles de NADH y potencial de membrana mitocondrial) se regulan por niveles fisiológicos de hipoxia. Estos autores propusieron que el descenso en la PO_2 inhibe el funcionamiento del CMIV, lo cual produce la despolarización de la mitocondria y la liberación de Ca^{2+} desde este orgánulo, que sería la señal que dispara la secreción de neurotransmisores en las células glómicas. No obstante, la hipótesis mitocondrial perdió apoyo cuando se demostró que el origen del Ca^{2+} necesario para la secreción en las células glómicas es el medio extracelular (Buckler and Vaughan-Jones, 1994; Fishman et al., 1985; Urena et al., 1994) y que el proceso de quimiotransducción implica a canales iónicos de la membrana plasmática. Además, ningún grupo ha podido demostrar la

existencia en las células glómicas de una citocromo c oxidasa de propiedades especiales. Algunos autores defensores de la hipótesis mitocondrial sugieren que en hipoxia se produce un descenso de los niveles de ATP como consecuencia de la disminución del flujo de electrones en la CTE. Esta caída en los niveles de ATP en respuesta a la hipoxia sería la señal que regula los canales de K⁺ en las células glómicas, bien directamente (Wyatt and Buckler, 2004) o través de la activación de la AMP quinasa (AMP *kinase*; AMPK) (Evans et al., 2005). Sin embargo, todavía no se ha demostrado que tal disminución de ATP citosólico tenga lugar en las células glómicas durante exposiciones a la hipoxia de solo 2 ó 3 minutos. Por el contrario, en muchas células los niveles de ATP se incrementan, en vez de disminuir, durante exposiciones breves a la hipoxia (Hochachka et al., 1996; Romero-Ruiz et al., 2012) y la inhibición de las corrientes de K⁺ se observa en células glómicas dializadas con 3 mM ATP (Lopez-Lopez et al., 1989).

En paralelo con la hipótesis metabólica mitocondrial, otra de las variables que se ha propuesto que podría tener un papel señalizador durante la hipoxia es la producción de especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS). En el CC la hipótesis más estudiada se basa en la producción de ROS por la NADPH oxidasa. Esta enzima está asociada a la membrana plasmática, existen varias isoformas localizadas en diversos tipos celulares, siendo la más estudiada la presente en fagocitos (Babior, 1999). La NADPH oxidasa cataliza la producción de superóxido (O₂⁻) empleando el NADPH como donador de electrones:



El O₂⁻ producido en esta reacción es la base para la generación de otras ROS. En tipos celulares no fagocíticos existen variantes menos activas de la NADPH oxidasa, que puede tener una importante función en la producción de ROS que actuarían como mensajeros intracelulares. Esta enzima se ha localizado en el CC mediante inmunohistoquímica (Kummer and Acker, 1995). Se ha propuesto que la NADPH oxidasa puede detectar y señalizar la hipoxia mediante un cambio en la tasa de producción de O₂⁻, que se transforma en H₂O₂ y oxida a los canales. No obstante, estudios en ratones KO de la

subunidad catalítica (*gp91*) de la NADPH oxidasa han mostrado que éstos tienen afectada la respuesta a hipoxia en los cuerpos neuroepiteliales (Fu et al., 2000) pero, sin embargo, el CC y la MA mantienen inalterada su sensibilidad a hipoxia (Roy et al., 2000; Thompson et al., 2002). Aunque estos datos descartan que la NADPH oxidasa tenga una función central en el mecanismo molecular de sensibilidad al O₂, puede que algunas de sus isoformas, presentes en otros tejidos, participen de alguna manera en la regulación de la respuesta a hipoxia (Lopez-Barneo et al., 2008).

Una fuente importante de ROS en las células es la CTE mitocondrial, ya que los electrones que escapan de ella reducen al O₂ produciendo O₂⁻, que es rápidamente transformado a H₂O₂ por la superóxido dismutasa mitocondrial; el H₂O₂ difunde a través de la membrana mitocondrial y pasa al citosol. Los principales puntos de producción de ROS en la mitocondria son los complejos mitocondriales I (CMI) y III (CMIII) (Drose and Brandt, 2012; Murphy, 2009). Aunque la producción de ROS en la CTE no constituye una hipótesis principal para el mecanismo de quimiotransducción de la hipoxia aguda en el CC, éste sistema basado en la regulación redox de canales de K⁺ se ha propuesto para explicar la sensibilidad a hipoxia de los miocitos de la arteria pulmonar (Archer et al., 2010; Waypa et al., 2010). En concreto, se ha señalado al CMIII como el responsable de desencadenar el proceso de VPH. Se ha sugerido que la producción de ROS en el CMIII, que tiene lugar al transferir electrones desde el ubiquinol hasta el citocromo c (ver “apartado 4”) (Chandel, 2010; Murphy, 2009), aumenta en hipoxia; el incremento de ROS inhibe los canales de K⁺ de la membrana e induce la VPH (Waypa et al., 2001). No obstante, existe un debate, ya tradicional, sobre si la hipoxia produce disminución (Michelakis et al., 2004) o aumento (Hamanaka and Chandel, 2010) de ROS mitocondrial. La hipótesis del CMIII ha sido apoyada por un trabajo reciente en el que se ha descrito un modelo de ratón KO con deficiencia del CMIII en células de músculo liso de la arteria pulmonar; en este modelo no se observa incremento de ROS en hipoxia ni se produce VPH (Waypa et al., 2013). A pesar de ello, se desconoce el posible mecanismo por el que el CMIII detecta los cambios de PO₂.

En los últimos diez años se han realizado diversos estudios que proponen mecanismos de detección de los cambios de PO₂ alternativos a la

mitocondria o la NADPH oxidasa. De entre ellos destacan los mediados por CO y H₂S. El CO es un producto de la hemo oxigenasa 2 (HO-2). Ésta es una enzima que se expresa de forma constitutiva y cataliza la degradación del grupo hemo, empleando NADPH y O₂ como cofactores y produciendo biliverdina, Fe²⁺ y CO (Kikuchi et al., 2005). Su función como sensor de O₂ se propuso al observarse que co-inmunoprecipita con la subunidad α de canales de K⁺ dependientes de Ca²⁺ (maxi-K) que, además, se sabe que son activados por CO (Williams et al., 2004). Este modelo propone que, en normoxia, la HO-2 produce CO, que mantiene abiertos los canales de K⁺. En condiciones de hipoxia, al disminuir la producción de CO debido a la escasez del O₂, se inhibiría la actividad de los canales de K⁺. Aunque un estudio en ratones KO de HO-2 mostró una atenuación de su RVH (Adachi et al., 2004), esta hipótesis no ha sido confirmada ya que las células tipo I de los ratones KO de HO-2 son tan sensibles a hipoxia como los controles (Ortega-Saenz et al., 2006). No obstante, es posible que la HO-2 pueda tener alguna función moduladora de la respuesta hipoxia en otras especies distintas al ratón debido a la diferencias que existen en la población de canales de K⁺ sensibles a O₂ (Lopez-Barneo et al., 2009; Peers et al., 2010; Ward et al., 2010).

El H₂S es una molécula gaseosa que actúa como mensajero y se ha descrito que su producción aumenta en hipoxia. El H₂S es generado por la enzima cistationina-gamma-liasa (CGL) durante la producción de cisteína y su inhibición, ya sea farmacológica o en ratones KO de la CGL, atenúa la respuesta a hipoxia del CC (Peng et al., 2010). Además, donadores exógenos de H₂S producen una activación del CC dosis dependiente y en un curso temporal similar al producido por la hipoxia. Como mecanismo de acción se ha propuesto que el H₂S inhibe directamente los canales maxi-K (Li et al., 2012) y, más recientemente, los canales TASK (Buckler, 2012), provocando la despolarización de la célula y la entrada de Ca²⁺ al citoplasma. El papel del H₂S está cuestionado debido a que en los ratones KO del gen de la CGL no se abole completamente la respuesta a hipoxia del CC. Además, experimentos farmacológicos realizados por nuestro grupo muestran que la inhibición de este enzima no afecta a la respuesta a hipoxia de las células del CC (Ortega-Sáenz et al., observaciones no publicadas). El H₂S es un potente inhibidor del CMIV, lo que podría explicar sus efectos sobre los canales iónicos (Buckler, 2012;

Prabhakar and Peers, 2014) y la sensibilidad a la hipoxia.

Es importante mencionar también que el sistema prolil-hidroxilasa/HIF, regulador general de las respuestas a la hipoxia crónica (Ratcliffe, 2013; Semenza, 2012), no parece participar de forma directa en la sensibilidad a la hipoxia aguda. La inhibición farmacológica de las prolil-hidroxilasas o la sobreexpresión genética de HIF, no tiene efecto alguno sobre la sensibilidad a la hipoxia de las células glómicas (Bishop et al., 2013; Ortega-Saenz et al., 2007). Se ha descrito que la sensibilidad a la hipoxia del CC está alterada en el ratón KO heterocigótico de HIF1 α (+/-) (Kline et al., 2002) no obstante estos datos han sido refutados por experimentos realizados en nuestro laboratorio utilizando registros amperométricos en rodajas del CC (Ortega-Saenz et al., 2007).

Una nueva perspectiva sobre el posible papel de la mitocondria en la sensibilidad aguda a la hipoxia en el CC se hizo evidente gracias a experimentos de nuestro grupo que mostraron que, como la hipoxia, la inhibición de los diferentes complejos mitocondriales activa a las células glómicas adultas de forma dependiente de Ca²⁺ extracelular (Figura 4A) (Ortega-Saenz et al., 2003). Además, se observó que la rotenona y el MPTP, inhibidores selectivos distales del CMI que actúan en el sitio de unión de ubiquinona, abolen la sensibilidad a la hipoxia con más eficacia que dosis saturantes de inhibidores de otros complejos mitocondriales (Figura 4B y C). La exposición a hipoxia aumentó la respuesta secretora en rodajas tratadas con inhibidores de los complejos II-IV, y del CMI pero que actúan en un sitio distinto al de unión de ubiquinona, mostrando que estos estímulos podrían actuar a mediante vías distintas (Figura 4C) (Ortega-Saenz et al., 2003). Los mismos resultados se obtuvieron en rodajas incubadas con metil-succinato, para facilitar el funcionamiento de la CTE a través del CMII, lo cual parecía indicar que el efecto de la rotenona y el MPTP ocluyendo la respuesta a hipoxia podía no ser estrictamente dependiente del flujo de electrones a través de la CTE. Estos datos fueron confirmados en una serie independiente de experimentos en los que además, se demostró que la rotenona no afecta a la sensibilidad de las células glómicas a la hipoglucemia (Figura 5 A y B). De hecho, en dicho estudio se observó la existencia de células glómicas que son sensibles a

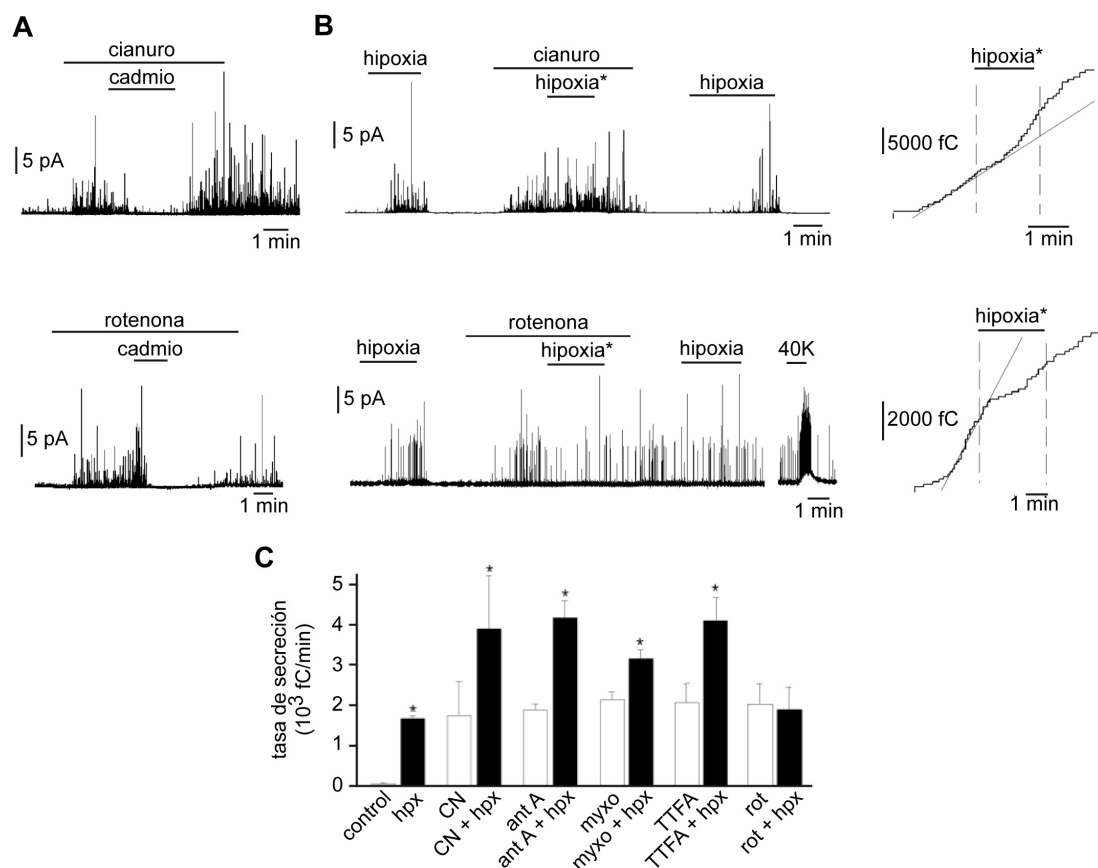


Figura 4. Efecto de los inhibidores mitocondriales sobre la respuesta a hipoxia de las células glómicas.

(A) Inhibición reversible por cadmio de la secreción inducida por los inhibidores mitocondriales (cianuro, rotenona), lo cual muestra la dependencia del Ca^{2+} extracelular. (B) Respuesta a hipoxia de las células glómicas en presencia de los inhibidores mitocondriales cianuro y rotenona; (derecha) secreción acumulada de la hipoxia en presencia de los inhibidores. Se aprecia el efecto acumulativo de la hipoxia sobre el cianuro pero no sobre la rotenona. (C) Cuantificación de la secreción de catecolaminas en rodajas de cuerpo carotídeo expuestas a cianuro (CN), antimicina A (ant A), myxotiazol (myxo), tenoil trifluoro acetona (TTFA), y rotenona (rot); inhibidores de los complejos mitocondriales IV, III, II y I, respectivamente; hipoxia (hpx) Modificado de Ortega-Sáenz *et al.*, 2003

hipoxia pero no a hipoglucemia y viceversa (Figura 5C). La oclusión de la respuesta a hipoxia por rotenona ha sido también descrita en células cromafines de la médula adrenal (Thompson *et al.*, 2007). En su conjunto, estos estudios sugieren que el CMI tiene una participación fundamental en el mecanismo sensor de la hipoxia aguda en el CC. Para confirmar o refutar esta idea se puso en marcha el proyecto de investigación sobre el que trata esta tesis doctoral.

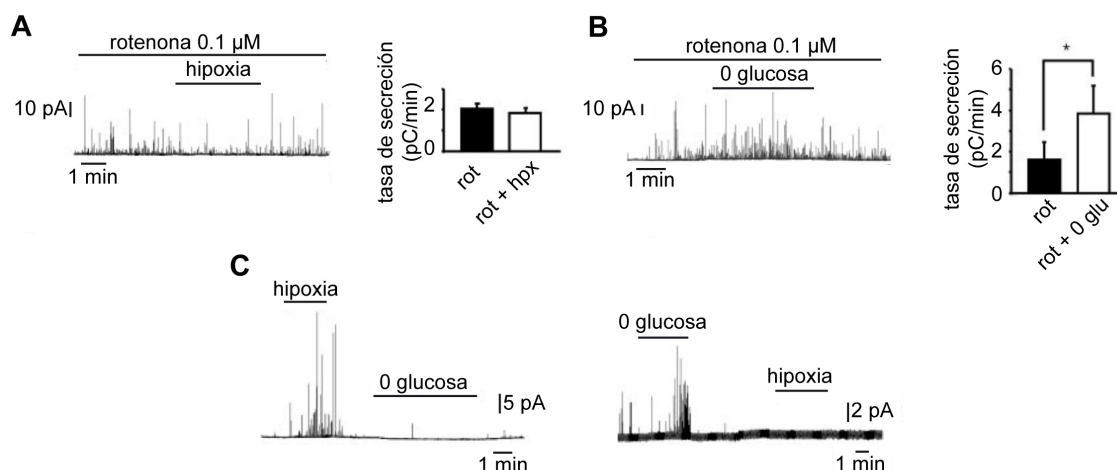


Figura 5. Sensibilidad diferencial de las células glómicas a hipoxia e hipoglucemia.

(A) Bloqueo de la sensibilidad a hipoxia (hpx) por la rotenona (rot). (B) Respuesta a hipoglucemia (0 glu) en presencia de rotenona. (C) Registros representativos de células glómicas que responden exclusivamente a hipoxia o a hipoglucemia. Modificado de García-Fernández *et al.*, 2007.

4. Aspectos generales de la función mitocondrial

4.1. El ciclo de Krebs y la cadena de transporte de electrones

La mitocondria es un orgánulo de doble membrana que se considera la central energética de la célula ya que es el principal productor de ATP. Éste se sintetiza mediante la fosforilación oxidativa, un proceso llevado a cabo por los complejos proteicos situados en las crestas mitocondriales y que rinde 15 veces más ATP que la glucólisis. Aunque ésta es la principal función que se atribuye a la mitocondria, este orgánulo también interviene en otros procesos como el tamponamiento de Ca^{2+} citosólico (Rizzuto *et al.*, 2012), la regulación del estado redox de la célula (mediante la producción de ROS) (Chandel, 2014), el inicio de la apoptosis (Liu *et al.*, 1996), la degradación de los ácidos grasos y otras rutas catabólicas y anabólicas, que requieren del ciclo de Krebs. La oxidación de los ácidos grasos y del piruvato produce acetil-CoA, que es oxidado completamente a CO_2 en el ciclo de Krebs. En este proceso se generan NADH y FADH_2 , que almacenan poder reductor y son necesarios para la síntesis de ATP en la fosforilación oxidativa (Figura 6).

Los complejos enzimáticos que llevan a cabo la fosforilación oxidativa son cinco (I-V) y se encuentran embebidos en la membrana interna

mitocondrial. Los complejos I-IV conforman la CTE y el complejo V es la ATP sintasa (Figura 6). La función de la CTE es generar un gradiente electroquímico que se emplea para la síntesis de ATP. En primer lugar, las moléculas con poder reductor, NADH y FADH₂ son oxidadas por los complejos mitocondriales I (CMI) y II (CMII), respectivamente. Los electrones pasan, en una cadena de reacciones de oxidación-reducción, desde estos complejos a la ubiquinona, que los cede al complejo III mitocondrial (CMIII), este al citocromo c y de ahí al complejo IV mitocondrial (CMIV) que los cede finalmente al O₂ produciendo H₂O. De manera acoplada a estas reacciones, los complejos I, III y IV translocan H⁺ desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana. La elevada concentración de H⁺ en el espacio intermembrana con respecto a la matriz genera un gradiente electroquímico que al disiparse en la ATP sintasa genera energía que se utiliza en el mismo complejo macromolecular para sintetizar ATP.

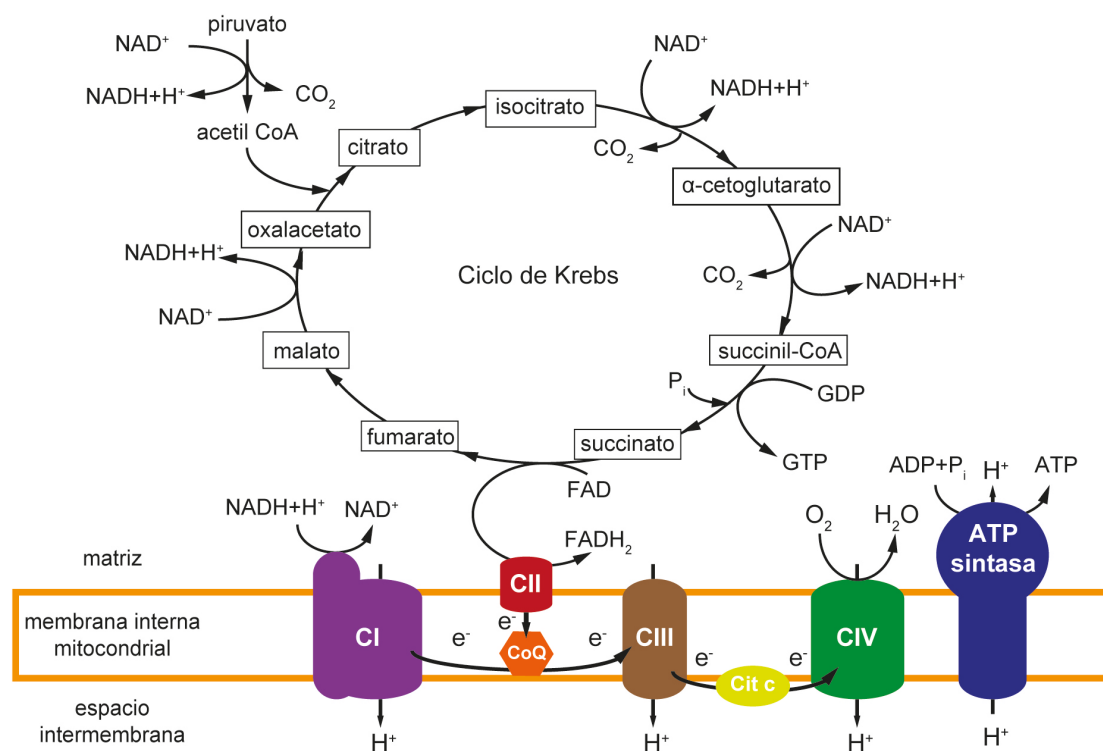


Figura 6. Ciclo de Krebs y fosforilación oxidativa.

4.2. Estructura del complejo I mitocondrial. Sitio de unión de la rotenona

El CMI o NADH: ubiquinona oxidorreductasa cataliza la transferencia de electrones desde el NADH hasta la ubiquinona. Este complejo tiene forma de “L”, con un dominio hidrofílico que sobresale hacia la matriz mitocondrial y un dominio hidrofóbico transmembrana (Figura 7A). El CMI de mamíferos consta de 45 subunidades, 7 de las cuales están codificadas por el genoma mitocondrial y el resto por el genoma nuclear, acumulando una masa total de 1 MDa. Catorce subunidades del CMI están muy conservadas y son fundamentales para su función, el resto de las subunidades son accesorias y se piensa que contribuyen al ensamblaje, la estabilidad o la regulación del CMI e, incluso, a protegerlo frente al estrés oxidativo. En el dominio hidrofílico se lleva a cabo la oxidación del NADH, que se une a la subunidad de Ndufv1 (51 kDa) y cede 2 electrones al flavín mononucleótido (FMN). De ahí, los electrones pasan a través de la cadena de 7 centros Fe-S (Figura 7B). El último centro Fe-S se denomina N2 y cede electrones a la ubiquinona, que se reduce secuencialmente, primero a semiquinona, aceptando un electrón y, finalmente, a ubiquinol al aceptar el segundo electrón. La ubiquinona se acomoda en la intersección entre los dominios hidrofílico e hidrofóbico, en un bolsillo formado por las subunidades Ndufs7 (PSST), Ndufs2 (49 kDa), mt-Nd1 (ND1) y Ndufs8 (TYKY) (Figura 7C), e interacciona directamente con un residuo de tirosina y otro de histidina de Ndufs2 (Baradaran et al., 2013; Hirst, 2013). En dicha subunidad se han descrito algunas mutaciones puntuales que disminuyen la afinidad del CMI por la ubiquinona (Kashani-Poor et al., 2001). En el presente trabajo se describe la generación y caracterización de dos modelos de ratón KO de la subunidad Ndufs2 del CMI, los cuales se han empleado para el estudio de la sensibilidad a la hipoxia aguda en los quimiorreceptores arteriales.

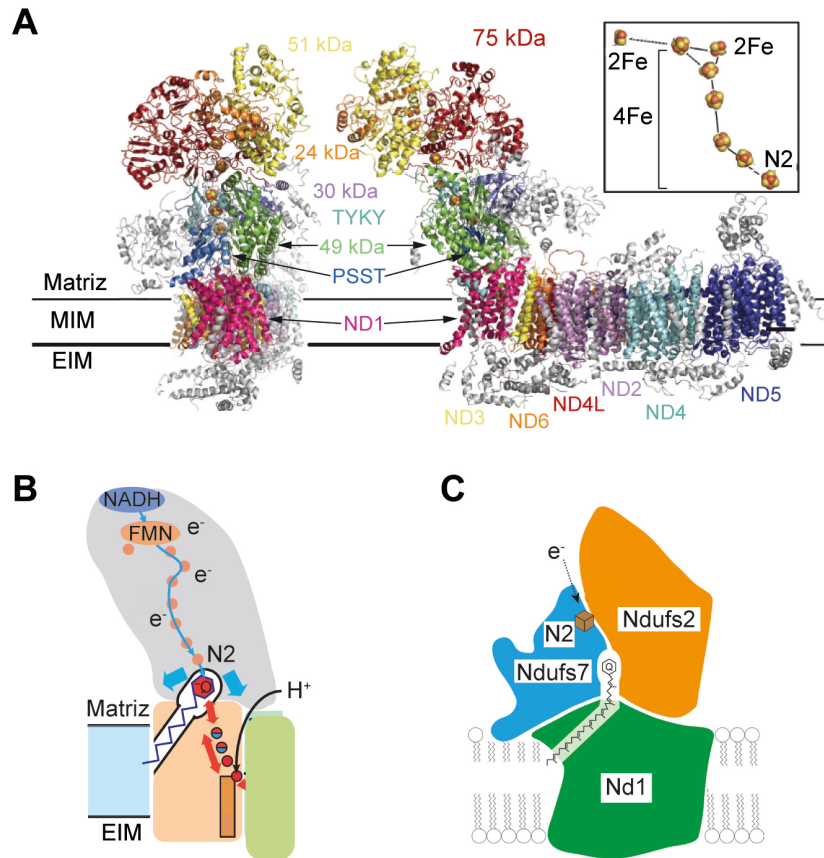


Figura 7. Estructura y sitio de unión de ubiquinona del complejo I mitocondrial.

(A) Vista del brazo periférico (izquierda) y del complejo I mitocondrial (CMI) completo (derecha). Se representan coloreadas las 14 subunidades conservadas y en gris las subunidades accesorias. A la derecha se muestra la organización de la cadena de centros Fe-S del brazo periférico del CMI. (B) Esquema de la reducción de la ubiquinona en el CMI. Se ilustra la transferencia de electrones, cedidos en la oxidación del NADH, a través de la cadena de centros Fe-S (círculos rosa) del brazo periférico (gris) hasta el centro N2, que reduce finalmente a la ubiquinona. (B) Esquema de las subunidades que conforman el bolsillo de unión de ubiquinona. PSST (Ndufs7); 49kDa (Ndufs2); MIM: membrana interna mitocondrial, EIM: espacio intermembrana (A) Modificado de Zickermann-Brandt, 2015 (A); Baradaran *et al.*, 2013 (B). Rhein *et al.*, 2013 (C).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis fue ahondar en el conocimiento de los mecanismos moleculares de la sensibilidad a hipoxia aguda en los quimiorreceptores arteriales. Observaciones previas de nuestro grupo mostraron que el bloqueo del sitio de unión de ubiquinona del complejo I mitocondrial (CMI) elimina la respuesta a hipoxia, por ello nos centramos en investigar la función del CMI en la sensibilidad a hipoxia aguda empleando modelos animales genéticamente modificados. Los objetivos concretos de esta tesis fueron:

1. Generar y caracterizar los modelos de ratón *knockout* condicionales de la subunidad Ndufs2 del CMI: TH-NDUFS2 y ESR-NDUFS2.
2. Estudiar la sensibilidad a hipoxia aguda del CC y la MA en el modelo TH-NDUFS2.
3. Estudiar la sensibilidad a hipoxia aguda del CC y la MA en el modelo ESR-NDUFS2.
4. Estudiar la función de la mitocondria en las células *knockout* de la subunidad Ndufs2 del CIM y su relación con la respuesta aguda a la hipoxia.
5. Estudiar la forma en la que el CMI señala a los canales de la membrana plasmática para producir la despolarización inducida por la hipoxia.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Generación de los ratones *knockout* condicionales para el gen de la subunidad *Ndufs2* del complejo I mitocondrial

1.1. El sistema Cre/loxP

Los ratones KO condicionales de la subunidad *Ndufs2* del CMI se generaron mediante el sistema Cre/loxP, que se basa en la capacidad de la enzima recombinasa Cre de reconocer las secuencias loxP y realizar una recombinación específica de sitio (Figura 8). Las secuencias loxP se insertan en regiones no codificantes del gen para generar el alelo “floxeado”. La expresión del alelo “floxeado” es normal hasta que se induce la Cre, que al recombinar las secuencias loxP deletiona el fragmento de ADN comprendido entre éstas. La expresión de la recombinasa Cre puede controlarse de forma espacial (restringida a determinados tipos celulares) y/o temporal (induciéndola en un momento determinado). De la misma forma funciona el sistema Flp/FRT (Schlake and Bode, 1994). En este caso la recombinasa es la flipasa (Flp) y reconoce los sitios FRT para llevar a cabo la recombinación específica de sitio. Para generar ratones condicionales del alelo *Ndufs2*, se siguió el procedimiento que se muestra esquemáticamente en la figura 9.

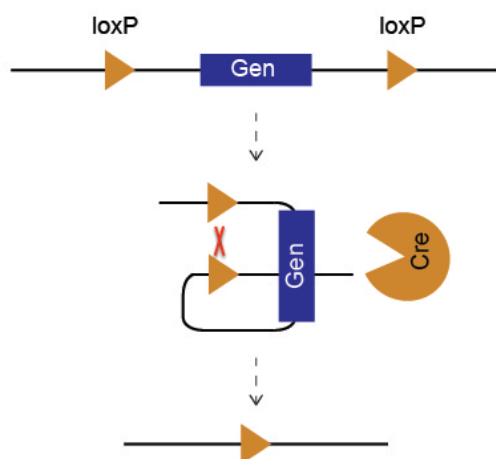


Figura 8. Delección de un gen mediante el sistema Cre/loxP.

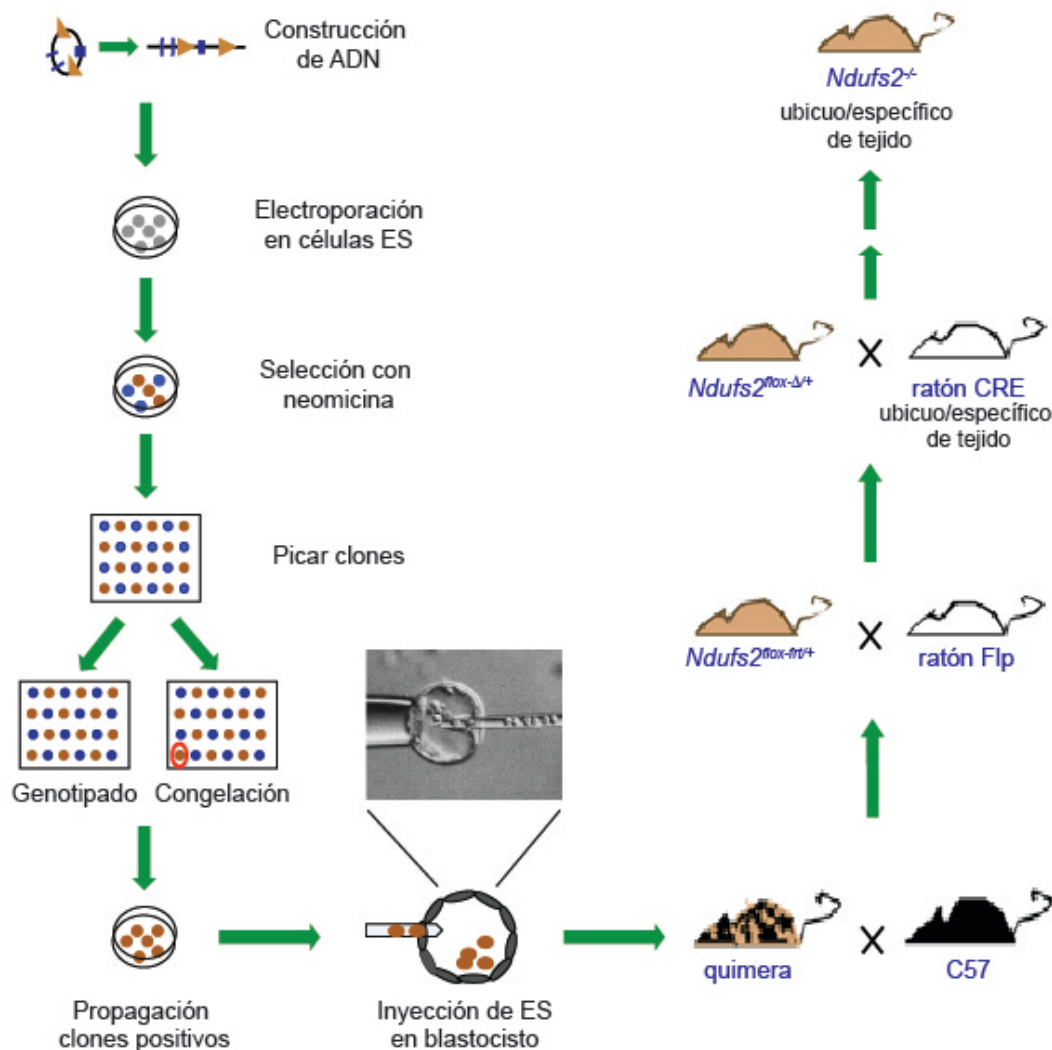


Figura 9. Diseño experimental de la generación de los modelos de ratón *knockout* de la subunidad *Ndufs2* del complejo I mitocondrial.

1.2. Clonación del gen *Ndufs2*

El alelo condicional *Ndufs2* se generó clonando el ADN de este gen a partir de una genoteca en fago λ de *Mus musculus* de la cepa 129 SvJ (Lambda Fix II, Stratagene). El muestreo de esta genoteca para identificar qué clones eran portadores de *Ndufs2* se llevó a cabo con una sonda de ADNc (4410260, IMAGE) de *Ndufs2* (NCBI: BC016097), mediante el método de hibridación. Se extrajo el ADN de los fagos λ positivos y se clonó en el vector pBluescript. Los plásmidos resultantes de este proceso se analizaron mediante digestión con enzimas de restricción y secuenciación. Se seleccionó un

plásmido que contenía el exón 2 de *Ndufs2*, que es el fragmento a delecionar en los modelos de ratón. Este exón estaba flanqueado por ADN genómico de longitud suficiente para que tuviese lugar el proceso de recombinación homóloga mediante el cual se insertará el alelo “floxeado” en el genoma el ratón. El plásmido seleccionado se denominó P49 (Figura 10A).

1.3. Generación del alelo condicional *Ndufs2*

El alelo condicional del gen *Ndufs2* se construyó a partir del plásmido P49 (Figura 10A). En él se introdujeron, mediante distintos pasos de clonación, las secuencias loxP y FRT y el gen de resistencia a neomicina (NeoR), que es necesario para el proceso de selección de las células madre embrionarias de ratón (ES). En primer lugar, se introdujeron las secuencias loxP, flanqueando al exón 2, y el gen NeoR a partir de un plásmido amablemente cedido por el Dr. Ignacio Piruat. El plásmido resultante, P49FN (Figura 10B), fue modificado, empleando el plásmido PL451 (NCBI) (Figura 10C), para introducir las secuencias FRT flanqueando al gen NeoR. Así se generó el plásmido P49FRT (Figura 10D), que contenía la construcción de ADN necesaria para generar el alelo condicional de *Ndufs2*. Para validar P49FRT se realizaron digestiones con varias enzimas de restricción y se secuenció. Una vez verificada la secuencia, se aisló ADN de P49FRT con el kit QIAfilterTM Plasmid Midi Kit (QIAGEN) según las instrucciones del fabricante. El plásmido aislado se linearizó digiriendo con la enzima SacII (New England Biolabs), se sometió a electroforesis en gel de agarosa y se purificó con el kit comercial QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN), según las instrucciones del fabricante.

1.4. Obtención de células madre embrionarias de ratón portadoras del alelo condicional *Ndufs2*

1.4.1. Cultivo de células madre embrionarias de ratón

Las células ES (ATCC) se cultivaron en medio compuesto por DMEM 44% (Dubelcco's Modified Eagle's Medium; Gibco), medio condicionado por las células BRL 44%, FBS 10% (Hyclone), aminoácidos no esenciales 0,5% (Gibco), penicilina/estreptomicina 0,5% (BioWhitaker), β -mercaptoetanol 20 nM (Sigma) y *Leukemia Inhibitory Factor* 0,1% (Esgro-LIF, Millipore). Las células se cultivaron en placas (Nunc), previamente tratadas con gelatina 0,1% para

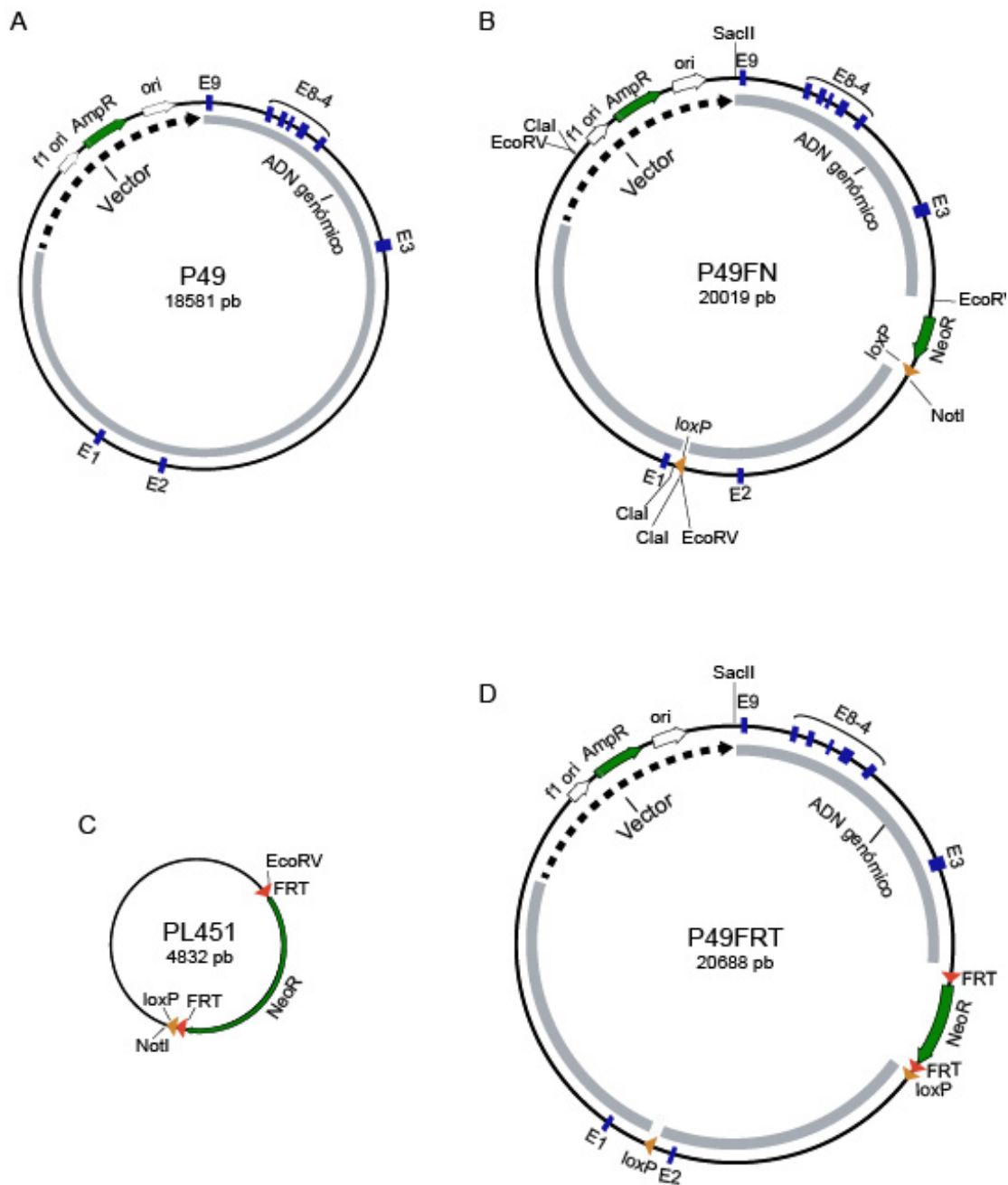


Figura 10. Plásmidos empleados en la generación del alelo condicional *Ndufs2*.
 (A) P49. (B) P49FN. (C) PL451. (D) P49FRT. E1-9: exones 1-9.

mejorar la adhesión celular, a 37°C y 5% CO₂. Para los pases sucesivos, las células se digirieron con tripsina/EDTA 0,25% (Gibco) durante 5 minutos en el incubador.

1.4.2. Cultivo de células BRL

El cultivo de células ES requiere medio condicionado por fibroblastos procedentes de hígado de rata búfalo (BRL). Estas células se cultivaron en DMEM suplementado con FBS 10%, penicilina/estreptomicina 1% y aminoácidos no esenciales 1%. Las células se mantuvieron en frascos de 175 cm² de superficie (Nunc) con 120 ml de medio a 37°C y 5% CO₂ durante 5-6 días. Este medio se filtró con Stericup 0,22 µm (Millipore) y se congeló a -20°C.

1.4.3. Generación de clones estables de células ES portadoras del alelo condicional *Ndufs2*

El plásmido P49FRT linearizado, portador de la construcción de ADN necesaria para generar el alelo condicional de *Ndufs2*, se electroporó en un cultivo de ES al 70-80% de confluencia (Figura 9). Se recogieron las células en una cubeta de electroporación (BioRad) con 700 µl de medio de células ES. Se añadieron 13 µg de plásmido linearizado y se aplicó un pulso eléctrico de 240 V, 500 µF (constante de tiempo: 6,5–7 ms) con un electroporador (Bio-Rad). Tras 10 minutos a temperatura ambiente, las células se sembraron en dos placas de 10 cm. 24 horas después se hizo un pase 1:5 de cada placa y se inició la selección de las células que habían incorporado la construcción añadiendo al medio de cultivo el análogo de la neomicina (geneticina G418; Gibco) a 200 µg/ml. El medio de selección se renovó diariamente para retirar las células que iban muriendo. Las células resistentes a neomicina crecen en forma de colonias aisladas (clones). Estos clones se picaron, se dispersaron con tripsina/EDTA 0,25% y se transfirieron a placas de 24 pocillos. Posteriormente, se duplicaron y se siguieron cultivando hasta que llegaron a la confluencia. Una de las placas duplicadas se empleó para el genotipado de los clones. La otra placa se congeló para conservarla; para ello, se despegaron las células con tripsina/EDTA 0,25%, se resuspendieron en medio con DMSO 10% (Sigma) y se almacenaron a -80°C.

1.4.4. Genotipado de clones de células ES mediante *southern blot*

Los clones de células ES resistentes a neomicina se genotiparon mediante la técnica de *southern blot* para comprobar la correcta inserción del alelo condicional *Ndufs2*. En primer lugar, se extrajo ADN de los clones ES y se

digirió con las enzimas *HpaI/ClaI* (Fermentas). Las digestiones se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0,7%. Finalizada la electroforesis, se trató el gel con HCl 0,25 N para despurinizar parcialmente el ADN, y se incubó con solución desnaturalizante (NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M). Mediante capilaridad, se transfirió el ADN del gel a una membrana (Pall 0,45 μ m, Biodyne) que, a continuación, se lavó con solución neutralizante (Tris 0,5 M, NaCl 3 M, pH 7) y SSC 2X (NaCl 3 M, citrato sódico 0,3 M, pH 6,4). La sonda empleada para detectar la correcta inserción del alelo condicional *Ndufs2* es un fragmento de ADN de 340 pb complementario a una región de ADN genómico de *Ndufs2*, en el extremo 5' y externa a la construcción (ver Figura 13 en "Resultados"). El marcaje radiactivo de la sonda con P³² (PerkinElmer) se realizó empleando el sistema comercial RediprimeTM (Amersham Biosciences), siguiendo las instrucciones del fabricante. La hibridación de la sonda de ADN marcada radiactivamente con el ADN en la membrana se realizó con solución de hibridación (ULTRAhyb, Ambion) en un rotor a 42°C durante toda la noche. Para eliminar la radiactividad unida de forma inespecífica, se lavó la membrana con SSC 2x/SDS 0,1% y SSC 0,1x/SDS 0,1% en el rotor a 42°C y, de nuevo con SSC 0,1x/SDS 0,1%, en agitación a 54°C. Para detectar la actividad radiactiva se reveló la membrana en el escáner Typhoon 9400 (Amersham Biosciences). Se descongelaron aquellos clones de células ES en los que se comprobó que el alelo condicional *Ndufs2* se había insertado correctamente en su locus mediante recombinación homóloga. Se expandieron estos clones y se comprobó de nuevo su genotipo mediante *southern blot*.

1.5. Generación de los ratones *knockout*

Los ratones portadores del alelo condicional *Ndufs2* se generaron mediante la microinyección de células ES portadoras de dicho alelo en la cavidad del blastocisto de embriones de ratón (Figura 2). Estos blastocistos, que poseían células ES silvestres y células ES modificadas con el alelo *Ndufs2* condicional, se implantaron en el útero de hembras pseudopreñadas. Estas hembras dieron a luz a quimeras, ya que parte de su cuerpo derivaba de las células silvestres y otra parte de las células modificadas. Las quimeras se cruzaron con ratones de la cepa C57BL/6. Aquellas quimeras cuyas células germinales procedían de las células ES modificadas produjeron descendencia

portadora del alelo *Ndufs2* condicional (*Ndufs2^{flox-frt}*). Estos ratones se cruzaron con ratones de la línea FLP (Rodriguez et al., 2000), que expresan la enzima Flipasa y, mediante recombinación, se eliminó el gen NeoR del alelo condicional *Ndufs2^{flox-frt}*. De esta forma, se generaron los ratones portadores del alelo condicional *Ndufs2* pero sin el gen NeoR (*Ndufs2^{flox}*).

Para generar las líneas de ratones KO condicionales de la subunidad *Ndufs2* del CMI se cruzaron ratones portadores del alelo *Ndufs2^{flox}* (floxeados) con líneas de ratones que expresan la recombinasa Cre. Los ratones TH-NDUFS2 (con ablación embrionaria del gen *Ndufs2* en las células catecolaminérgicas) se generaron cruzando los ratones floxeados con ratones de la línea TH-IRES-Cre (Lindeberg et al., 2004), en los que la recombinasa Cre se expresa bajo el promotor del gen *Th*. Por otro lado, para generar la línea ESR-NDUFS2 (con ablación generalizada del gen *Ndufs2* en la vida adulta) se utilizaron ratones que expresan la recombinasa Cre de forma inducible por tamoxifeno (TMX) (Hayashi et al., 2003).

1.6. Mantenimiento y tratamiento de los modelos de ratón *knockout*

Los ratones se estabularon en condiciones de libre acceso a agua y comida, a una temperatura constante (22±1°C) y con un ciclo alternante de 12 horas de luz/oscuridad. Previamente a la extracción de tejidos para experimentación los animales se anestesiaron con tiopental (90-120 mg/kg). Los tejidos se congelaron en N₂ líquido y se almacenaron a -80°C.

A los ratones de la línea ESR-NDUFS2 se les suministró una dieta especial con 400 mg/Kg de tamoxifeno (TMX) (Teklad CRD TAM400/CreER Irradiated, Harlan), durante 4 semanas, cuando tenían en torno a 2 meses para eliminar la expresión de *Ndufs2*. Después, se alimentaron de nuevo con la dieta habitual hasta su sacrificio.

Los experimentos realizados con animales en esta tesis doctoral han sido aprobados por el Comité de Investigación Animal de la Universidad de Sevilla.

1.7. Genotipado de los modelos de ratón *knockout* condicionales

1.7.1. Comprobación del genotipo mediante *southern blot*

Los modelos de ratón KO condicionales generados son portadores del alelo *Ndufs2^{flox}*. La comprobación de su genotipo se llevó a cabo mediante

southern blot. Para ello se extrajo ADN genómico del cerebro de los ratones empleando el kit Genomic DNA (QIAGEN) según las instrucciones del fabricante. A partir de este punto se procedió de la misma forma descrita para las células ES en el “apartado 1.4.4”.

1.7.2. Genotipado rutinario mediante PCR

El genotipado de los ratones se realizó mediante PCR convencional a partir de una muestra de tejido de los dedos. Se extrajo ADN genómico de esta muestra mediante digestión con 150 µl de tampón *PCR Direct* (Viagen Biotech) y 0,3 µg/µl de proteinasa K durante 2 h 45 min a 800 rpm y 57°C. Se inactivó la proteinasa K durante 45 min a 85°C.

Las mezclas de reacción de las distintas PCRs contenían 1 µl de ADN molde, 5 µl de tampón 10x, MgCl₂ 1,5 mM, 0,2 mM de cada desoxirribonucleótido (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 20 µM de los cebadores específicos de los fragmentos de ADN que se quieren amplificar y 1,5 U de la *Taq* polimerasa (Bioline). Los alelos *Ndufs2*⁺ (143 pb), y *Ndufs2*^{fl^{ox}} (355 pb) se amplificaron con los cebadores Fx51 y Fx31 y el alelo *Ndufs2*⁻ (550 pb) con Fx51 y FRT1. En la Tabla 2 se muestran los cebadores empleados para amplificar los distintos alelos y el gen de la recombinasa Cre.

Tabla 2. Secuencia de los cebadores empleados para el genotipado de los ratones por PCR.

Nombre	Secuencia (5'-3')
Fx51	ATAAGAGTGGATAGGATGTTT
Fx31	CATTTCTCCCTTCCCGTC
FRT1	AGTGGCAGAACAATAGAGTGATCCAGGG
Cre lo	ACGGGCACTGTGTCCAG
Cre up	TG TTCAGGGATCGCCAG

2. Medida de la función respiratoria mediante pletismografía

Los parámetros respiratorios de los ratones se analizaron en condiciones de normoxia e hipoxia mediante pletismografía. Se midió la frecuencia respiratoria de animales controles y mutantes en un pletismógrafo (EMKA Technologies) con el programa iox8 (EMKA Technologies). El sistema dispone de dos cámaras de registro en las que de forma simultánea se registraron ratones control y KO. El protocolo experimental constaba de dos ciclos de normoxia/hipoxia, en los que la hipoxia se mantuvo durante al menos 5 minutos. Los valores analizados de frecuencia respiratoria en normoxia se registraron en los intervalos al 19-21% O₂ y en hipoxia al 9-10% O₂. Para el análisis estadístico sólo se tuvieron en cuenta las medidas en las que la tasa de éxito indicada fue del 100%.

3. Técnicas de biología molecular y bioquímica

3.1. Análisis de la expresión génica mediante PCR cuantitativa

Para extraer ARN, se homogeneizó el CC, el GCS y la MA con el politrón (Pro Scientific) y se empleó el kit RNeasy micro (QIAGEN). El riñón y el corazón, se homogeneizaron con el politrón y se empleó TRIzol (Life Technologies), según las instrucciones del fabricante. El ARN obtenido se congeló a -80°C y se cuantificó en el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

Para el análisis de la expresión génica en CC, dado su pequeño tamaño, fue necesario agrupar los CC de 3-4 ratones como una sola muestra y realizar una preamplificación previa a la retrotranscripción. Para ello se empleó el kit WT Expression kit (Ambion) según el manual del fabricante.

Se retrotranscribieron 0,5 µg de ARN con el kit QuantiTec Reverse Transcription kit (QIAGEN), según el protocolo del fabricante, para obtener ADNc. Las reacciones de PCR cuantitativa de CC, GCS y MA se realizaron con 1,7 µl de ADNc y las de riñón y corazón con 1 µl de ADNc. Se emplearon el reactivo TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems) y sondas TaqMan (Applied Biosystems) para la amplificación del ADNc de interés. Estas reacciones se llevaron a cabo en un termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). El nivel de expresión del gen de estudio se

analizó mediante cuantificación relativa ($\Delta\Delta C_t$) empleando el gen de la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*Gapdh*) como gen *housekeeping*.

3.2. Análisis de proteínas mediante *western blot*

El GCS y la MA se homogeneizaron con 100 μ l de tampón RIPA (Sigma), suplementado con 1% de cóctel inhibidor de proteasas (Sigma) y 1% de cóctel inhibidor de fosfatasas (Sigma), empleando arena blanca de cuarzo (Sigma) y un pistilo de vidrio. El riñón y el corazón se homogeneizaron con el politrón en la misma solución empleada para GCS y MA. Las muestras se incubaron en hielo durante 15 minutos y se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se volvió a centrifugar y el sobrenadante final obtenido se almacenó a -20°C. La cantidad de proteína extraída se determinó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Se midió la absorbancia a 595 nm de longitud de onda en el espectrofotómetro con lector de placas (Multiskan Spectrum, Thermo).

Para realizar análisis de electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 10% se cargaron 10 μ g de proteína de GCS y MA y 50 μ g de riñón y corazón. Posteriormente, se realizó la transferencia de proteínas a una membrana de PVDF (GE Healthcare) mediante el método semiseco con solución de transferencia (Tris 14,9 mM, glicina 12 mM y metanol 20%). Después, se trató la membrana durante 30 minutos con solución de bloqueo (leche desnatada 5% en PBS con Tween 0,05%) y se incubó toda la noche, a 4°C, con el anticuerpo primario (Tabla 3). Al día siguiente, se lavó con PBS con Tween 0,05%, se incubó con el anticuerpo secundario (Tabla 3) durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavó de nuevo con PBS con Tween 0,05%. Finalmente, se reveló la membrana con el kit Clarity Western ECL substrate (BioRad) durante 5 minutos a temperatura ambiente. La cantidad de proteína estudiada se normalizó con respecto a las proteínas β -actina y Rpl26. Para detectar las proteínas y cuantificar se utilizó el sistema ImageQuant LAS 400 mini (GE Healthcare) y el software ImageQuantTL, respectivamente.

Tabla 3. Anticuerpos utilizados para la detección de proteínas mediante *western blot* e inmunohistoquímica.

Antígeno	Tipo de anticuerpo	Dilución	Compañía	Método
Ndufs2	Primario	1:1000	Abcam	WB
Ndufs1	Primario	1:10000	Abcam	WB
Ndufv2	Primario	1:1000	Abcam	WB
mt-Nd1	Primario	1:100	Abcam	WB
Sdha	Primario	1:10000	Abcam	WB
Sdhb	Primario	1:200	Abcam	WB
Uqcrrs1	Primario	1:1000	Abcam	WB
mt-Co1	Primario	1:2000	Abcam	WB
b-actina	Primario	1:5000	Abcam	WB
Rpl26	Primario	1:1000	Sigma	WB
TH	Primario	1:5000	Novus	IHC
anti IgG conejo peroxidasa	Secundario	1:10000	Thermo Scientific	WB
anti IgG ratón peroxidasa	Secundario	1:20000	Amersham	WB
anti IgG conejo Alexa 568	Secundario	1:500	Invitrogen	IHC
anti IgG conejo peroxidasa	Secundario	1:2	Dako	IHC

WB: *western blot*; IHC: inmunohistoquímica.

3.3. Análisis de proteínas mitocondriales mediante *blue native* PAGE y *western blot*

Para detectar los complejos mitocondriales, se combinó la técnica de *blue native* PAGE (BN-PAGE) y la de *western blot* siguiendo un protocolo previamente descrito (Wittig et al., 2006). Los extractos mitocondriales de riñón se obtuvieron tal y como se describe más adelante en el “apartado 6.1”. Se emplearon 400 µg de extracto mitocondrial, se centrifugó a 15000 g durante 10 minutos y se resuspendió el pellet en 40 µl de tampón de solubilización (NaCl 50 mM, Imidazole/HCl 50 mM, ácido 6-aminohexanoico 2 mM, EDTA 1mM, pH 7) al que se añadió digitonina 6 µg/µg mitocondria. Se centrifugó a 20000 g durante 10 minutos y se tomó el sobrenadante, al que se añadió 5 µl de glicerol 50% y tinte azul de Coomassie G-250 1 µg/8 µg digitonina. Se cargaron 125 µg de cada muestra en un gel de gradiente de acrilamida (4% al 13%) y se procedió con la electroforesis a 4°C durante 3 horas aproximadamente. Finalmente, para visualizar los complejos mitocondriales, se tiñó el gel con solución de tinción (azul de Coomassie R-250 0,25%, metanol 40%, ácido acético 10%).

Con el objetivo de identificar los complejos mitocondriales identificarlos en el gel BN-PAGE, se realizó un *western blot* frente a algunas de las subunidades de dichos complejos mitocondriales. En primer lugar, se destiñó el gel con metanol 25% y ácido acético 10%. A continuación, se llevó a cabo la transferencia, a 4°C, de los complejos mitocondriales desde el gel BN-PAGE a una membrana PVDF. Antes de proceder con el *western blot*, se trató la membrana PVDF con metanol para desteñir completamente las bandas. Desde este punto, se procedió tal y como se describe en el “apartado 3.2”. En la tabla 3 se indican los anticuerpos empleados en estos experimentos.

3.4. Medida del nivel de succinato

La determinación del nivel de succinato se realizó en muestras de rata. Se empleó el kit colorimétrico Succinate (Succinic Acid) Colorimetric Assay Kit (BioVision), según las instrucciones del fabricante. Para cada réplica se homogeneizaron 10 CC, 2 MA y 10 mg de cerebro con arena blanca de cuarzo y un pistilo de vidrio. Se midió la absorbancia de las muestras a 450 nm. La

cantidad de succinato se normalizó con respecto a la cantidad de proteína determinada mediante el método Bradford y se expresó como nmol/ μ g proteína.

4. Técnicas histológicas

4.1. Inmunohistoquímica de fluorescencia en secciones de criostato

Las bifurcaciones carotídeas y las glándulas adrenales se fijaron con paraformaldehído (PFA) 4%, pH 7,4 (Sigma) en PBS a 4°C, durante 4 horas. Se pasaron después a una solución de sacarosa 30% (Sigma) en PBS para crioprotegerlas y se dejaron al menos 24 horas, a 4°C. Posteriormente, se incluyeron en OCT (TissueTek) y se guardaron a -80°C. Se realizaron 6 series de secciones de 10 μ m en el criostato (Leica). Las secciones se conservaron a -20 °C.

Los cortes de bifurcaciones y glándulas adrenales se permeabilizaron en PBS con Tritón 0,1% (Tritón X100 0,1% (Sigma) en PBS) y se incubaron con solución de bloqueo (FBS 10% y BSA 1mg/ml en PBS-Tritón 0,1%) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para detectar la proteína TH se incubó con el anticuerpo primario frente a TH (Tabla 3) durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, se incubaron los cortes con el anticuerpo secundario (Tabla 3) durante 1 hora a temperatura ambiente y con Dapi 1 μ g/ml en PBS durante 10 minutos para marcar los núcleos. Finalmente, se sellaron los cortes con medio de fluorescencia (Dako).

4.2. Inmunohistoquímica con peroxidasa en secciones de parafina

El volumen de la MA se estimó empleando secciones de parafina. Las glándulas adrenales se fijaron en PFA 4% durante 4 horas a 4°C. Se deshidrataron embebiéndolos en soluciones de etanol de gradación creciente y en xilol, en el procesador de tejidos automático (Leica). Finalmente, se incluyeron en parafina. Las glándulas adrenales se cortaron en secciones de 10 μ m con el microtomo (Leica) y se recogieron en 6 series, desechando 6 cortes entre serie y serie. Para la inmunohistoquímica, se rehidrató el tejido, mediante lavados con xilol, diluciones de etanol de gradación decreciente y H₂O destilada. Para detectar la proteína TH se empleó el anticuerpo primario frente a TH (Tabla 3) y el kit EnVision + System-HRP 3, 3'-diaminobenzidina (DAB) (Dako), que contiene el anticuerpo secundario conjugado con la peroxidasa de

rábano (Tabla 3). Tras el marcaje, se reveló con DAB. Por último, se deshidrataron los cortes y se montaron con medio DPX (Sigma).

4.3. Cuantificación de volumen y número de células

Las imágenes empleadas para el análisis cuantitativo se tomaron con un microscopio Olympus BX61 con cámara digital asociada. Las imágenes mostradas en las figuras de esta tesis se tomaron con un microscopio confocal Leica TCS SP2.

El volumen y el número de células se calcularon empleando muestras teñidas con inmunohistoquímica frente a TH y se empleó el programa ImageJ (NIH). Para calcular el volumen del CC y de la MA se midió su área en todas las secciones de una serie y se empleó la fórmula *Volumen=área x altura*. A continuación, se sumó el volumen de todas las secciones de dicha serie y se multiplicó por el número de series realizadas al cortar. En el caso de la MA, se tuvieron en cuenta para el cálculo del volumen los cortes desechados al realizar las series. El número de células tipo I del CC se estimó contando las células marcadas con TH en todas las secciones de CC de una serie con el programa Image J (NIH). Se sumó el número de células TH⁺ de todos los cortes de una serie y se multiplicó por el número de series para calcular el número de células tipo I del CC completo.

5. Microscopía electrónica de transmisión

Para estudiar con detalle algunas de las estructuras subcelulares de las células glómicas (número de mitocondrias y vesículas de centro denso) se llevaron a cabo análisis de microscopía electrónica. Los ratones se perfundieron con PBS y, a continuación, con una solución fijadora de PFA 4% (Sigma) y glutaraldehído 10% (v/v) (Electron Microscopy Sciences) en PBS. Se extrajeron las bifurcaciones carotídeas y se mantuvieron durante 4 horas en la misma solución fijadora. Posteriormente, se incluyeron en gelatina con glutaraldehído 0,08% (v/v) y se cortaron en rodajas de 50 µm con un vibratomo Leica VT 1000S. El procesamiento consta de los siguientes pasos: posfijación con tetróxido de osmio 1% durante 1 hora a 4°C, lavados con tampón cacodilato, tinción con acetato de uranilo 2% durante 2 horas a 25°C, lavados en serie con acetona desde 30% al 100% para deshidratar el tejido, inclusión en resina Spurr

(Tedpella) y polimerización en un horno a 70°C durante 7 horas. Tras el procesamiento se obtuvieron bloques de resina que se cortaron en secciones semifinas (200 nm). Estas secciones se tiñeron con azul de toluidina 1% para identificar con un microscopio óptico las regiones de interés y se realizaron los cortes ultrafinos (70 nm) con un ultramicrotomo Leica UC7 equipado con una cuchilla de diamante. Los cortes obtenidos se colocaron sobre una rejilla de cobre. Las imágenes se adquirieron con un microscopio electrónico de transmisión Zeiss Libra 120 con una cámara digital asociada (Veleta). El número de vesículas de centro denso y el área mitocondrial de las células tipo I del CC se cuantificaron con el programa ImageJ (NIH). El número de vesículas de centro denso se normalizó por sección celular y el área mitocondrial con respecto al área de citoplasma.

6. Actividad mitocondrial

6.1. Ensayo *in vitro* de la actividad de los complejos I y II mitocondriales

El ensayo de la actividad de los complejos mitocondriales se llevó a cabo en mitocondrias aisladas de riñón y corazón. La extracción de mitocondrias se basó en un procedimiento previamente descrito (Fernandez-Vizarra et al., 2002). En primer lugar, se troceó el tejido y se homogeneizó con un pistón de teflon motorizado en un homogeneizador Dounce. La homogeneización se realizó en medio B/H (sacarosa 75 mM, sorbitol 225 mM, EGTA 1 mM, BSA 0,1%, Tris-HCl 10 mM pH 7,4) si se trataba de corazón, o medio L/K (sacarosa 320 mM, EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,4), si se trataba de riñón. A continuación, se centrifugó a 1000 g durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se volvió a centrifugar a 12000 g durante 5 min a 4°C. El pellet de mitocondrias se resuspendió en medio B (sacarosa 0,25 mM, HEPES 2 mM, EGTA 0,1 mM, pH 7,4), se alicuotó y se congeló en N₂ líquido. Las muestras se almacenaron a -80°C. La cantidad de proteína del extracto mitocondrial se determinó mediante el método Bradford.

La medida de la actividad de los compeljios I y II mitocondriales se realizó siguiendo un procedimiento previamente descrito (Birch-Machin and Turnbull, 2001). En primer lugar, se añadió tampón C1/C2 (KH₂PO₄ 25 mM, MgCl₂ 5 mM, KCN 3 mM, BSA 2,5 mg/ml, pH 7,2) a las alícuotas de extractos mitocondriales. Se centrifugaron a 13200 rpm durante 10 min a 4°C y se resuspendió el pellet

en tampón C1/C2 a una concentración de 1 µg/µl. Estas muestras se congelaron y descongelaron rápidamente 3 veces pasándolas de N₂ líquido a un baño a 30°C para fragmentar las mitocondrias y hacer accesibles los complejos de la CTE.

La medida de la actividad del CMI se basa en la reducción de la absorbancia del NADH al ser oxidado a NAD⁺ por el CMI. Este ensayo se emplearon 10-20 µg de extracto mitocondrial y se llevó a cabo a 30°C en presencia de ubiquinona 0,13 mM (Sigma), NADH 0,13 mM (Roche) y antimicina A 3,6 µM (Sigma). La absorbancia se midió cada 10 segundos, durante 2 minutos, a 340 nm de longitud de onda en el espectrofotómetro (DU730, BeckmanCoulter). A continuación, se añadió rotenona 5 µM (Sigma) y se volvió a medir. La actividad del CMI se determinó a partir de la diferencia en la tasa de disminución de la absorbancia de NADH antes y después de la adición de rotenona. La actividad se normalizó con respecto a la cantidad de proteína y se expresó como nmoles de sustrato oxidado por minuto y por cantidad de proteína empleada en el ensayo (nmol/min/mg).

La medida de la actividad del CMII se basa en la disminución de la absorbancia del 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP) al ser reducido por el CMII de forma acoplada a la oxidación de succinato. Para el ensayo se emplearon 5-20 µg de extracto mitocondrial y se midió a 600 nm y 30°C cada 10 segundos, durante 2 minutos en presencia de succinato 20 mM (Sigma), DCPIP 50 nM (Sigma), antimicina A 3,6 µM, rotenona 5 µM y ubiquinona 70 nM. La actividad se normalizó de la misma forma que en los ensayos del CMI.

6.2. Medida del consumo de oxígeno dependiente de los complejos I y II mitocondriales

La extracción de mitocondrias se llevó a cabo según un protocolo previamente descrito (Fernandez-Vizarra et al., 2002). Todo el procedimiento se llevó a cabo en el mismo día. Se sacrificaron los ratones, se extrajeron los riñones y se procesaron en 5 ml/g de medio de homogenización (sacarosa 320 mM, EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,4). En primer lugar, se troceó el tejido con unas tijeras y se homogeneizó con un pistón de teflon motorizado en un homogeneizador Dounce. El homogeneizado se centrifugó a 1000 g durante 5 min a 4°C. El sobrenadante se volvió a centrifugar a 13000 g durante 2 min a

4°C. El pellet se resuspendió en medio de homogenización. Se repitió este último paso y se resuspendió el pellet en medio MAITE (Tris-HCl 10 mM pH 7,4, sacarosa 25 mM, sorbitol 75 mM, KCl 100 mM, K₂HPO₄ 10 mM, EDTA 0,05 mM, MgCl₂ 5 mM y BSA 1 mg/ml). Las muestras se mantuvieron siempre en hielo con agua hasta realizar la medida. La medida del consumo de oxígeno se realizó con un electrodo de Clark con el sistema Oxygrap Plus (Hansatech). Para medir la tasa de consumo de O₂ se usaron 100 µg de mitocondrias en 1 ml de medio MAITE suplementado con ADP 1 mM, K₂HPO₄ 2 mM. Se realizó una medida continua de la concentración de O₂ en la preparación mientras se añadían los distintos reactivos. En primer lugar, se añadieron los sustratos del CMI, piruvato 5 mM y malato 5 mM, después se añadió rotenona 2 µM. El consumo de O₂ de este primer intervalo se debe a la actividad del CMI. Seguidamente, se añadió succinato 10 mM, que es sustrato del CMII y finalmente, antimicina A 2 µM. El consumo de O₂ de este intervalo se debe a la actividad del CMII. El consumo de O₂ se normalizó respecto a la cantidad de proteína, determinada mediante el método Bradford, y se expresó como nmoles de O₂ consumidos por minuto y por cantidad de proteína empleada en el ensayo (nmol/min/mg).

6.3. Medida del nivel de ATP

Las muestras del CC, el GCS y la MA. se homogeneizaron con arena blanca de cuarzo en 100 µl de tampón de homogenización (Tris 100 mM, EDTA 4 mM, pH 7,75) con un pistilo de vidrio. Se hirvieron durante 3 minutos, se incubaron en hielo durante 2 minutos, se centrifugaron a 1000 g durante 1 minuto a 4°C y se recogió el sobrenadante.

Para determinar la cantidad de ATP se usó el kit ATP Bioluminescence Assay CLS II (Roche), siguiendo las indicaciones del fabricante. Este kit se basa en la actividad de la enzima luciferasa, que requiere ATP para metabolizar su sustrato en un producto fluorescente. Se midió en un luminómetro Glomax 96 (Promega). La señal obtenida es proporcional a la cantidad de ATP. La cantidad de ATP se normalizó respecto a la absorbancia medida a 260 nm.

7. Cultivos primarios

7.1. Rodajas de cuerpo carotídeo

Las rodajas de CC se realizaron siguiendo un procedimiento previamente descrito (Pardal et al., 2000; Piruat et al., 2004). Se extrajeron las bifurcaciones y se diseccionaron los CC en PBS frío. Los CC se incluyeron en agarosa de bajo punto de fusión (SeaKem GTG, Lonza) al 1% en PBS a una temperatura de 42°C. Se solidificó el bloque de agarosa en hielo y se cortaron los CC en rodajas de 150 µm de grosor en un vibratomo (VT 1200S, Leica). Las rodajas se incubaron en 3 ml de solución de dispersión (tripsina I 2600 BAEE U/ml (Sigma), colagenasa II 0,3-3 FALGPA U/ml (Sigma), elastasa 1,25 U/ml (Calbiochem), CaCl₂ 0,05 mM en PBS) durante 5 minutos en el baño a 37°C con agitación suave. A continuación, se retiró la solución de dispersión, se lavaron las rodajas 2 veces con PBS frío y se incubaron en medio de cultivo (DMEM (Gibco), FBS 10% (Biowhittaker), penicilina/estreptomicina 1% (Biowhittaker), L-glutamina 1% (Biowhittaker), glucosa 5 mM, insulina 0,1 U/ml (Actrapid), eritropoyetina (EPO) 2 U/ml a 37°C, 5% CO₂. Las rodajas se registraron al día siguiente.

7.2. Células dispersas de cuerpo carotídeo

Se extrajeron los CC y se incubaron en 3 ml de solución de dispersión (ver “apartado 7.1”) durante 20 minutos en el incubador a 37°C y 5% CO₂. A continuación, los CC se estiraron en el microscopio con 2 agujas estériles para ayudar a la disgregación del tejido y se incubaron en las mismas condiciones durante 5 minutos más. Finalmente, se pipeteó para dispersar mecánicamente los CC y se paró la reacción con DMEM con FBS 10% frío. Se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos y el pellet se resuspendió en medio completo. Se sembraron las células sobre cubres tratados con poli-L-lisina (Sigma). El medio de cultivo utilizado para las células dispersas es el mismo que el descrito para las rodajas (ver 7.1) pero sin EPO. Las células dispersas se registraron al día siguiente.

7.3. Rodajas de médula adrenal

Se extrajeron las glándulas adrenales de los ratones y se diseccionaron para aislar las médulas en PBS frío. Éstas se incluyeron en agarosa y se

cortaron siguiendo un procedimiento similar al del CC (Garcia-Fernandez et al., 2007). En este caso, la inclusión se realizó a 46°C y las rodajas se cortaron con un grosor de 200 μm . Las rodajas de MA se incubaron en la solución de normoxia (tabla 4) burbujeada con carbógeno (95% O_2 y 5% CO_2) durante al menos 30 minutos o hasta ser registradas. Los registros se llevaron a cabo durante 6-8 horas desde la preparación de las rodajas.

8. Registro de la actividad secretora celular mediante amperometría

La técnica de amperometría permite registrar la actividad secretora de las células mediante un electrodo de fibra de carbono polarizada con un voltaje fijo superior al potencial redox de la molécula a detectar (+750-800 mV para las catecolaminas). El electrodo polarizado se situó próximo a la célula de forma que los neurotransmisores secretados en respuesta a un estímulo se oxidan cediendo electrones a la fibra de carbono y generan una corriente eléctrica detectable con el sistema de registro (Ureña et al., 1994) (Figura 11). Mediante esta técnica, se registraron las catecolaminas liberadas en respuesta a diferentes estímulos por las células tipo I en rodajas de CC y las células cromafines en rodajas de médula adrenal.

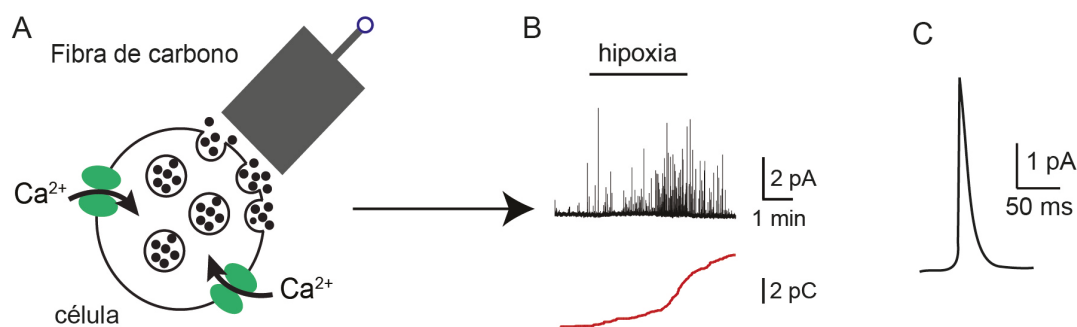


Figura 11. Detección de catecolaminas mediante amperometría.

(A) Esquema de la liberación de dopamina detectada por la fibra cercana a la célula secretora. (B) Registro amperométrico y secreción acumulada (debajo). La integral (área) de cada espiga (en culombios) representa la carga de las catecolaminas contenidas en una vesícula. (C) Evento único (espiga) amperométrico ampliado.

Para realizar los experimentos, las rodajas de CC se perfundieron con las soluciones detalladas en la tabla 4. Las diferentes tensiones de O₂ se consiguieron burbujeando la solución estándar con diferentes mezclas de gases. La comprobación del estado fisiológico de las células se realizó despolarizándolas con una solución de alto potasio. La osmolaridad de las soluciones fue de 300 mOsm/kg y el pH 7,4, ajustado al burbujear con 5% CO₂. Todos los experimentos se realizaron a 37°C.

Tabla 4. Soluciones de registro (I).

	Normoxia	Hipoxia	Hipercapnia	0 glucosa	40 K ⁺
NaCl	117	117	117	117	81,5
KCl	4,5	4,5	4,5	4,5	40
NaHCO ₃	23	23	23	23	23
MgCl ₂	1	1	1	1	1
CaCl ₂	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
glucosa	5	5	5	0	5
sacarosa	5	5	5	10	5
% O ₂	20	0	20	20	20
% CO ₂	5	5	20	5	5
% N ₂	75	95	60	75	75

Las concentraciones de los reactivos están expresadas en mM y los gases en %.

8.1. Dispositivo electrónico de amplificación y registro

La fibra de carbono (10 µm, AMOCO) con la que se detectaron las catecolaminas se polarizó mediante un voltámetro (npi electronic, GMBH) conectado al amplificador (EPC-8, HEKA Electronics). La corriente generada en la fibra por la oxidación de las catecolaminas se midió con un amplificador

operacional configurado como convertidor corriente/voltaje, de forma que el voltaje de salida del amplificador fue proporcional a la corriente generada en la fibra. Esta señal se filtró de forma analógica (filtro de paso bajo con una frecuencia de corte de 100 Hz) y se digitalizó mediante un convertidor analógico-digital (ITC-16, *Instrutech Corporation*). Los datos se adquirieron con el programa Pulse 8 (*HEKA Electronics*) y se analizaron con el programa *Igor Pro* (*Wavemetrics*).

8.2. Análisis de la señal amperométrica

Los registros amperométricos están compuestos por señales relativamente rápidas (espigas) que representan la corriente generada en la fibra por la oxidación de las catecolaminas (Figura 11). Cada espiga corresponde a un evento discreto de secreción debido a la fusión de una vesícula, o vesículas pre-fundidas (exocitosis compuesta), con la membrana plasmática de la célula. El área comprendida bajo la espiga es el valor de la carga de las moléculas de catecolaminas liberadas al fusionarse la vesícula.

La respuesta secretora se expresó como la tasa de secreción (carga/tiempo) en fC/min. Para ello se cuantificó la carga total de las espigas registradas durante el minuto de máxima secreción frente al estímulo. La secreción acumulada se calculó como la integral en el tiempo del registro amperométrico. También se calculó el porcentaje de células que responden a cada estímulo. Para ello, sólo se incluyeron aquellas células que respondieron a alto potasio y se consideró que una célula respondía al estímulo si su secreción aumentó al menos el doble de la secreción basal.

9. Microfluorimetría

Esta técnica permite detectar cambios en las concentraciones intracelulares de distintas moléculas mediante marcadores fluorescentes específicos. Estos marcadores fluorescentes tienen la propiedad de que cuando son excitados con una determinada longitud de onda, emiten con diferente intensidad en función de las concentraciones de la molécula que son capaces de detectar. Mediante esta técnica se estudiaron los efectos de los diferentes estímulos sobre los niveles de Ca^{2+} intracelulares, así como el efecto de la hipoxia sobre los niveles de NADH en el citoplasma y de las ROS en el espacio

intermembrana mitocondrial. La composición de las soluciones de registro se muestra en la tabla 4. En los experimentos de succinato, se añadió succinato sódico y ácido metil-succínico a las soluciones de registro. En todos los experimentos, realizados a 37°C, se sustrajo la fluorescencia basal antes de analizar la señal.

9.1. Medida de cambios en la concentración citosólica de Ca^{2+}

Los cambios en la concentración intracelular de Ca^{2+} se monitorizaron con el indicador ratiométrico Fura-2 *acetoxymethyl ester* (AM) (TefLabs MW 1002) (Ortega-Saenz et al., 2013; Urena et al., 1994). Este indicador atraviesa la membrana celular y queda atrapado en el citoplasma cuando las esterasas celulares cortan el grupo -AM. Cuando se excita el Fura-2 con una longitud de onda de 340 nm, la intensidad de emisión a 510 nm aumenta de forma directamente proporcional al incremento de la concentración citosólica de Ca^{2+} . Si la excitación se realiza a una longitud de onda de 380 nm, los cambios en la emisión son inversamente proporcionales al incremento citosólico de dicho ión. Las células dispersas se cargaron durante 40 minutos en medio sin FBS con 2 μM de Fura-2AM en el incubador. Posteriormente, se lavaron durante 10 minutos en medio sin Fura-2AM y se registraron. Los cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelular se expresaron como cambios relativos a partir del ratio de emisión a 340/380.

9.2. Medida de cambios en la concentración de NADH

El NADH es una molécula autofluorescente. Para medir los cambios en la concentración de NADH producidos por la hipoxia se empleó un protocolo no ratiométrico en el que se excitaron las células glómicas dispersas con luz ultravioleta (360 nm) y se detectó la fluorescencia emitida a 460 nm (Buckler and Turner, 2013; Duchon and Biscoe, 1992a). Los cambios en la concentración de NADH citosólico se expresaron como cambios relativos a partir del valor de autofluorescencia detectada en normoxia al inicio del experimento.

9.3. Medida de la producción de especies reactivas de oxígeno en el espacio intermembrana mitocondrial

Los experimentos se llevaron a cabo tanto en rodajas como en células dispersas de CC empleando el indicador redox ratiométrico roGFP fusionado con la glicerol fosfato deshidrogenasa (GPD), una enzima que se expresa en el espacio intermembrana mitocondrial (Waypa et al., 2010). Los cultivos se transdujeron con vectores adenovirales GPD-roGFP ($2,2 \times 10^{12}$ partículas virales/ml, Viraquest) y se registraron a las 48 horas de la transducción. El indicador roGFP se excitó a 400 y 480 nm y la fluorescencia emitida se detectó a 525 nm. Los niveles máximos de oxidación y reducción se determinaron añadiendo ditioneitol (DTT) 1 mM y ter-butil-hidroperóxido (THB) 1mM, respectivamente. Los cambios en la producción de ROS del espacio intermembrana mitocondrial se expresaron como cambios relativos a partir del ratio de emisión a 400/480. Las rodajas de CC transfectadas con GPD-roGFP se tiñeron con MitoTracker® Deep Red FM (Molecular Probes, invitrogen) durante 45 minutos para visualizar las mitocondrias.

9.4. Equipamiento de registro

El *set-up* para realizar los experimentos de microfluorimetría consta de un microscopio invertido (Axiovert 35, Zeiss) equipado con óptica convencional para epifluorescencia y fotometría. Para excitar, dispone de un monocromador (Polychrome V, T.I.L.L. Photonics) y un espejo dicróico. El sistema de detección consta de un filtro y una cámara CCD (C11440, Hamamatsu, Japón). El programa utilizado fue el Aquacosmos (Hamamatsu).

10. Registro de las corrientes iónicas y el potencial de membrana mediante la técnica de *patch-clamp*

Para caracterizar las propiedades electrofisiológicas de las células glómicas del CC se utilizó la técnica de *patch-clamp* adaptada a nuestro laboratorio (Ganfornina and Lopez-Barneo, 1991; Hamill et al., 1981; Horn and Marty, 1988; Ortega-Saenz et al., 2010). Esta técnica consiste en establecer una unión de alta resistencia, del orden de gigaohmios, entre la punta de una micropipeta de vidrio y la membrana de la célula. De esta forma se puede controlar el potencial de la membrana plasmática y registrar los cambios en las

corrientes iónicas (modo *voltage-clamp*) o bien, registrar los cambios producidos en el potencial de membrana (V_m) generados al aplicar distintos estímulos (modo *current-clamp*). Las distintas configuraciones de la técnica de *patch-clamp* están descritas en numerosas publicaciones y en trabajos previos de nuestro grupo (Hamill et al., 1981; Ortega-Saenz et al., 2010). En el presente trabajo utilizamos las configuraciones de *whole-cell* y de parche perforado. En la primera, una vez formado el sello de alta resistencia, se aplica un pulso de succión para romper el parche de membrana celular en contacto con la micropipeta. De esta forma se accede al interior de la célula, que se dializa con la solución interna contenida en la micropipeta de registro. En la configuración de parche perforado se añade anfotericina B a la solución interna para que, una vez formado el sello, esta sustancia difunda a la membrana y forme poros por el que pasan los iones, el agua y moléculas de diámetro menor a ~ 200 Da (Linley, 2013). Con esta última configuración se evita la diálisis de ATP y otras macromoléculas citosólicas.

10.1. Medida de las corrientes iónicas mediante *voltage-clamp*

El modo de *voltage-clamp* permite fijar el potencial de la membrana plasmática y registrar el paso de iones a través de canales voltaje-dependientes y a través de canales no dependientes de voltaje, también llamados canales *background* o *leakage*. En el modo de *voltage-clamp* se llevaron a cabo diferentes protocolos experimentales. Por un lado, en la configuración de *whole-cell*, se realizaron registros de corrientes iónicas a través canales voltaje-dependientes mediante la aplicación de pulsos despolarizantes de diferente duración. Por otro lado, en la configuración de parche perforado, se aplicaron protocolos de rampa para observar la variación de la corriente a diferentes potenciales, permitiendo analizar tanto canales *leakage* como voltaje-dependientes. Los experimentos para analizar la regulación de la corriente por hipoxia e hipercapnia, se realizaron también en la configuración de parche perforado aplicando protocolos de rampa y pulsos despolarizantes.

La composición de las soluciones externas e internas empleadas para el registro de las corrientes voltaje-dependientes de Na^+ , Ca^{2+} y K^+ en la configuración de *whole-cell* se muestra en la Tabla 5A. La concentración de

anfotericina B usada en los experimentos de parche perforado fue de 240 $\mu\text{g/ml}$) (Tabla 5B). Para medir el efecto de hipoxia e hipercapnia sobre las corrientes iónicas se emplearon las soluciones descritas en la Tabla 4. Estas soluciones contienen bicarbonato, lo cual dificulta la realización del sello. Debido a esto, se utilizó una solución externa con HEPES (solución externa de K^+ ; ver Tabla 5A) para hacer el sello y, a continuación, se pasó a la solución con bicarbonato para realizar el experimento. En los experimentos realizados en ausencia de sodio, se sustituyó el NaCl por N-metil-D-glucamina (NMDG). En cada experimento, el pH de la solución interna se ajustó a 7,2 y la osmolaridad fue de 285 mOsm/kg mientras que el pH y la osmolaridad de la solución externa fue de 7,4 y 300 mOsm/kg, respectivamente.

10.2. Medida del potencial de membrana mediante *current-clamp*

Los cambios en el potencial de membrana se analizaron mediante la configuración de fijación de corriente (*current-clamp*) de la técnica de *patch-clamp*. Dichos experimentos se llevaron a cabo en la configuración de parche perforado. Las soluciones externa e interna empleadas se describen en las Tablas 4 y 5.

10.3. Equipamiento de registro

El dispositivo utilizado en nuestro laboratorio para el registro de las corrientes iónicas consta de un amplificador EPC-10 USB (Heka Elektronik) y un ordenador equipado con el software de adquisición Patch Master (Heka Elektronik). Las señales eléctricas se filtraron a 10 kHz y se digitalizaron con un intervalo de 20 μs . El análisis de los datos se realizó con los programas Igor 6 (Wavemetrics) y Patch Master Fit (Heka Elektronik).

11. Análisis estadístico de los datos

Los datos se presentan como la media \pm error estándar de la media. La comparación de dos grupos independientes se realizó mediante el test *t* de *Student*. Para comparar más de dos grupos independientes se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) y a continuación los tests *post hoc* de *Tukey* o de *Student-Newman-Keuls*. Los datos que no se ajustaron a una distribución normal se analizaron con el test no paramétrico *U-Mann Witney*. Las diferencias

entre los grupos estudiados se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor de p fue menor de 0,05.

Tabla 5. Soluciones de registro (II).

A

	Externa	
	I_{Na} y I_{Ca}	I_K
NaCl	140	140
BaCl ₂	9	-
CaCl ₂	1	2,5
KCl	2,5	2,5
HEPES	10	10
MgCl ₂	-	4
glucosa	10	10

B

	Interna (whole-cell)	
	I_{Na} y I_{Ca}	I_K
CsCl	110	-
glutamato potásico	-	80
KCl	-	50
CsF	30	-
HEPES	10	10
EGTA	10	5
ATP-Mg	4	4
MgCl ₂	-	1

		Interna (parche perforado)
K ₂ SO ₄		70
KCl		30
HEPES		10
MgCl ₂		2
EGTA		1
anfotericina (µg/ml)		240

Las concentraciones de los reactivos están expresadas en mM.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Generación de los modelos de ratón *knockout* condicionales para el gen de la subunidad *Ndufs2* del complejo I mitocondrial

1.1. Construcción del alelo condicional *Ndufs2^{flox-frt}*

El alelo *Ndufs2^{flox-frt}* se generó a partir del ADN genómico de *Mus musculus* de la cepa 129 SvJ. Se seleccionó un fragmento de *Ndufs2* que comprendía al exón 2, que es la región que se iba a escindir, se clonó en el vector pBluescript y se generó así el plásmido P49. En P49 se insertaron, mediante distintos pasos de clonación, los sitios loxP flanqueando al exón 2 (P49FN) y el gen de resistencia a neomicina flanqueado por los sitios FRT (P49FRT) (ver “apartado 1.3” de Materiales y Métodos). Los plásmidos linearizados P49FN y P49FRT se validaron mediante análisis de restricción (Figura 12). La secuencia de P49FRT se confirmó también mediante secuenciación ya que este plásmido contenía la construcción final del ADN con la secuencia modificada de *Ndufs2*. En la figura 13A se muestran el alelo silvestre *Ndufs2* y las variaciones de éste que se han generado.

1.2. Obtención de células madre embrionarias de ratón portadoras del alelo condicional *Ndufs2^{flox-frt}*

El plásmido P49FRT linearizado se introdujo en las células ES mediante electroporación. Los clones de células ES portadores de la secuencia modificada de *Ndufs2* se seleccionaron añadiendo neomicina al medio de cultivo. Los clones resistentes al antibiótico se genotiparon mediante *southern blot*. De los 197 clones comprobados, 29 habían incorporado a su genoma el alelo *Ndufs2^{flox-frt}* de forma correcta mediante recombinación homóloga. Los clones de células positivos se descongelaron, se expandieron y se recomprobaron mediante *southern blot* (Figura 13B).

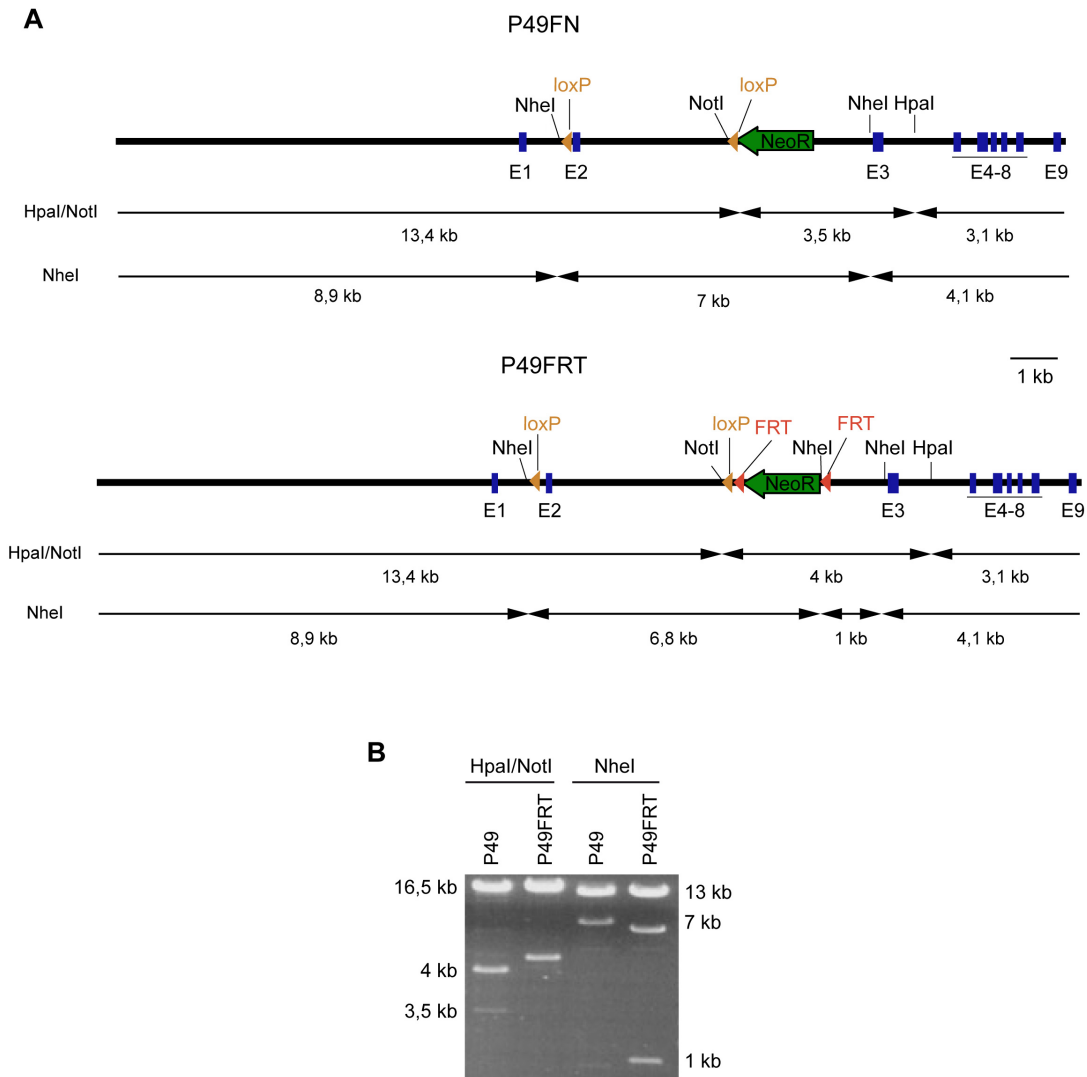


Figura 12. Análisis de restricción de P49FRT.

(A) Mapas de restricción de los plásmidos linealizados P49FN y P49FRT. Se indican los exones (E1-9), el gen de resistencia a neomicina (NeoR), los sitios de corte de las enzimas empleadas para el análisis de restricción y la longitud de los fragmentos esperados. (B) Electroforesis de las digestiones de los plásmidos P49FN y P49FRT con *HpaI/NotI* y *NheI*.

1.3. Generación de las líneas de ratón *knockout* condicional TH-NDUFS2 y ESR-NDUFS2

Los clones de células ES positivos se inyectaron en el blastocisto de hembras de la cepa C57 en gestación para obtener quimeras, las cuales se cruzaron con ratones de la cepa C57. Aquellas quimeras que habían incorporado el alelo *Ndufs2*^{fllox-*frt*} en células de la línea germinal, tuvieron descendencia con fenotipo mixto de la línea C57 y 129 SvJ. Estas crías de

fenotipo mixto eran heterocigotas para el gen *Ndufs2* (*Ndufs2^{flox-frt/+}*). El genotipo de estos ratones heterocigotos se confirmó mediante *southern blot* (Figura 13C). Posteriormente, se deletionó el gen NeoR del alelo *Ndufs2^{flox-frt}* cruzando los ratones portadores de este alelo con ratones de la línea FLP/ROSA26. Las crías obtenidas de este cruce eran portadoras del alelo condicional *Ndufs2* sin el gen de resistencia a neomicina (*Ndufs2^{flox}*).

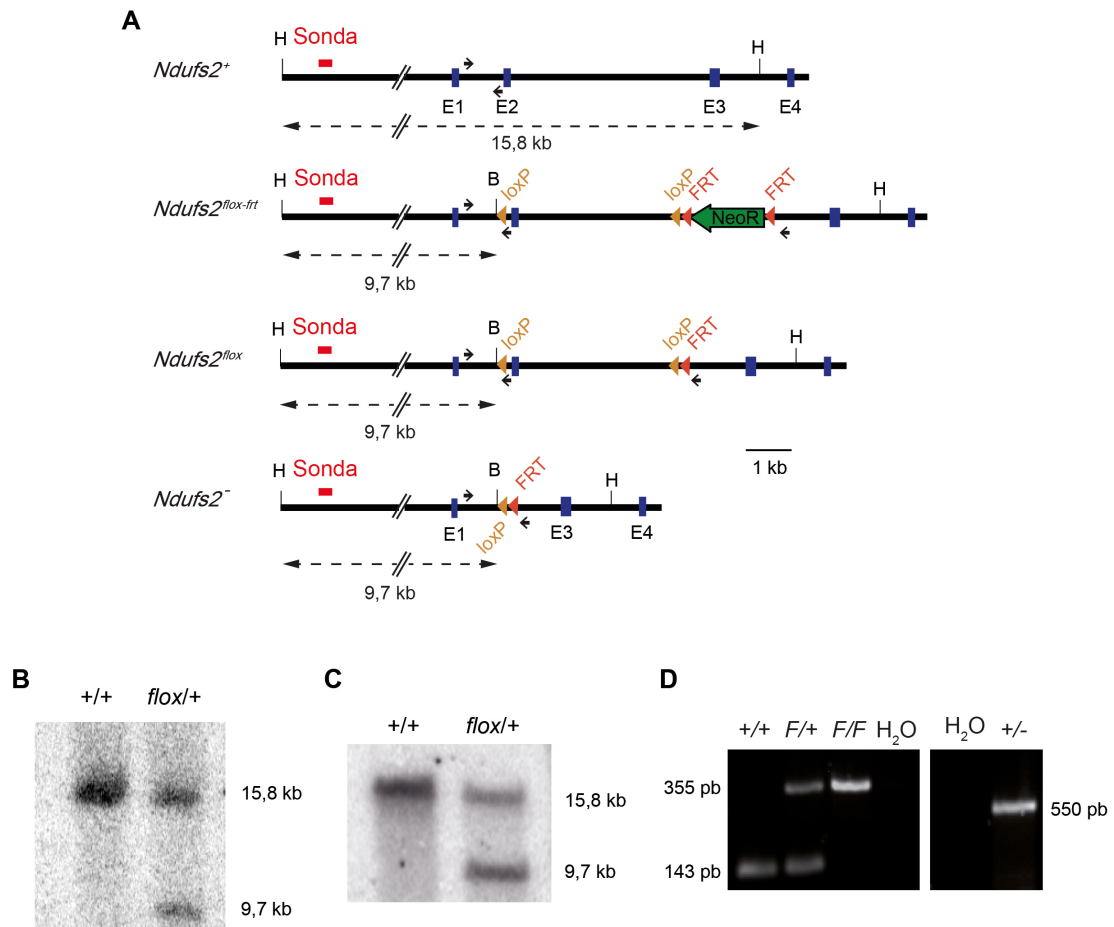


Figura 13. Esquema de los alelos *Ndufs2* y genotipado de ES y ratones TH-NDUFS2 mediante *southern blot* y PCR.

(A) Alelo silvestre *Ndufs2* (*Ndufs2⁺*), alelos floxeados *Ndufs2^{flox-frt}* y *Ndufs2^{flox}*, y alelo nulo *Ndufs2⁻*. Los exones (E1-4) se representan como rectángulos azules. Se indica la posición de la sonda empleada para *southern blot*, las dianas de restricción *HpaI* (H) y *BmtI* (B) y los cebadores de PCR (→). (B-C) *Southern blots* de células ES (B) y de cerebro de ratón (C). (D) Genotipado de ratones *Ndufs2^{+/+}* (+/+), *Ndufs2^{flox/+}* (F/+), *Ndufs2^{flox/flox}* (F/F) y *Ndufs2^{+/-}* (+/-).

Debido a que la ausencia de *Ndufs2* de forma ubicua y embrionaria es letal se generaron las líneas TH-NDUFS2 y ESR-NDUFS2. En la línea TH-NDUFS2 la ablación del gen *Ndufs2* se lleva a cabo solo en las células catecolaminérgicas. Para ello los ratones portadores del alelo *Ndufs2*^{flox} se cruzaron con ratones de la línea TH-IRES-CRE, que expresa recombinasa Cre de forma constitutiva bajo el promotor del gen tirosina hidroxilasa –*Th*- (Lindeberg et al., 2004). La Cre escinde el exón 2, impidiendo así la transcripción funcional de *Ndufs2*. En la figura 13D se muestra el genotipado de ratones de esta línea mediante PCR. Por otro lado, los ratones portadores del alelo *Ndufs2*^{flox} se cruzaron con ratones de la línea CRE-ESR1 (Hayashi et al., 2003) para generar la línea ESR-NDUFS2. En esta cepa, la expresión de la recombinasa Cre es ubicua pero condicionada en el tiempo; es necesario inducir la expresión de la Cre mediante la administración DE TMX.

2. Estudio de los ratones TH-NDUFS2

2.1. Estado general y desarrollo de los animales TH-NDUFS2

Los ratones TH-NDUFS2 aparecieron en las camadas en proporción mendeliana y no presentaron ningún rasgo que permitiese distinguirlos de los controles en los primeros días de vida. Sin embargo, a partir del primer mes, el aumento de peso fue más lento en los ratones KO. La diferencia de peso fue significativa a P30 en machos y a P50, en las hembras (Figura 14A), dando lugar a que casi todos los animales KO (-/-) muriesen a partir de P60-70. Por este motivo, los estudios experimentales en los ratones de la línea TH-NDUFS2 se realizaron con animales de unos 2 meses de edad (Figura 14B). Las causas de la muerte de los ratones TH-NDUFS2 o los efectos de la delección del gen *Ndufs2* sobre neuronas centrales no se han estudiado todavía con detalle y no se tratan en el presente trabajo.

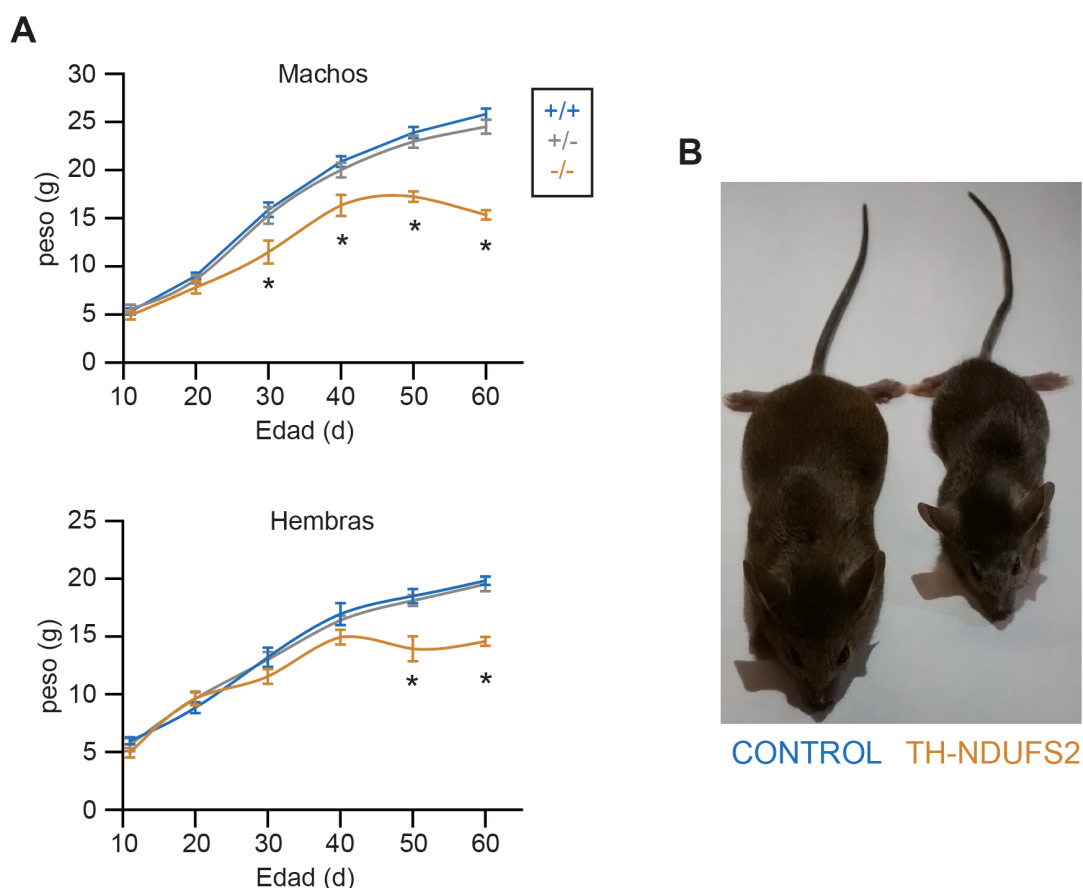


Figura 14. Evolución del peso de los ratones TH-NDUFS2.

(A) Curvas de peso de machos (n=8-23/grupo/edad) y hembras (n=5-20/ grupo/edad).
 (B) Foto representativa de ratones controles y TH-NDUFS2 a P60. d: días. *p<0,05

2.2. Estructura y niveles de ARNm y proteína Ndufs2 en el sistema simpatoadrenal

Antes de llevar a cabo los estudios funcionales se analizó, mediante PCR cuantitativa, la expresión del gen *Ndufs2* en tejidos catecolaminérgicos del SNP de los ratones TH-NDUFS2. Como era esperable, el nivel de ARNm de *Ndufs2* descendió significativamente en el CC, el GCS y la MA de los ratones KO (-/-) (Figura 15A-C). Para descartar posibles efectos inespecíficos, se analizó el nivel de expresión del gen *Sdh*, una subunidad del CMII (Díaz-Castro et al., 2012), y la cantidad de ARNm fue similar en todos los genotipos (Figura 15A-C). En paralelo a los estudios con ARNm se analizaron los niveles de proteína Ndufs2 mediante *western blot*. La cantidad de Ndufs2 en el GCS y la MA de los ratones KO (-/-) fue significativamente

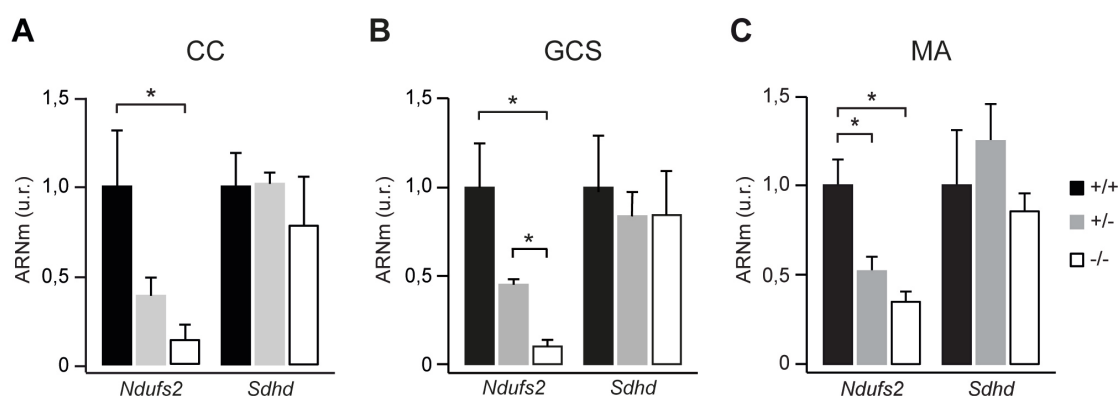


Figura 15. Análisis de la expresión de *Ndufs2* y *Sdh* en tejidos catecolaminérgicos del sistema nervioso periférico de ratones TH-NDUFS2 mediante PCR cuantitativa.

Cantidad relativa de ARNm de los genes *Ndufs2* y *Sdh* en cuerpo carotídeo (CC; A), ganglio cervical superior (GCS; B) y médula adrenal (MA; C). n=3-5/grupo, u.r.: unidades relativas. *p<0,05; ** p<0,01.

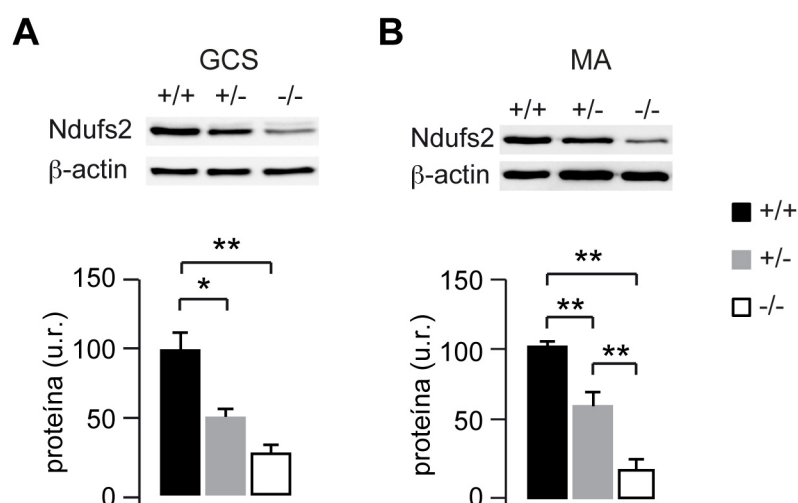


Figura 16. Análisis de la expresión de la subunidad *Ndufs2* en tejidos catecolaminérgicos del sistema nervioso periférico de ratones TH-NDUFS2 mediante western blot.

Comparación de los niveles de proteína *Ndufs2* de los ratones KO (-/-) y heterocigotos (+/-) con respecto a los controles (+/+) en ganglio cervical superior (GCS; A) y médula adrenal (MA; B). n=4-5/grupo. u.r.: unidades relativas. *p<0,05; ** p<0,01

menor que en los controles (Figura 16). Los niveles de proteína del CC no pudieron analizarse ya que, debido al pequeño tamaño de este tejido, la cantidad de proteína extraída no fue suficiente para cuantificarla mediante

estudios de *western blot*. Estos resultados muestran que la delección del gen *Ndufs2* se llevó a cabo de forma efectiva en CC, GCS y MA, con el consecuente descenso significativo en los niveles de proteína *Ndufs2*, y sin producir un efecto compensatorio detectable en la expresión de la subunidad *Sdhb* del CMII.

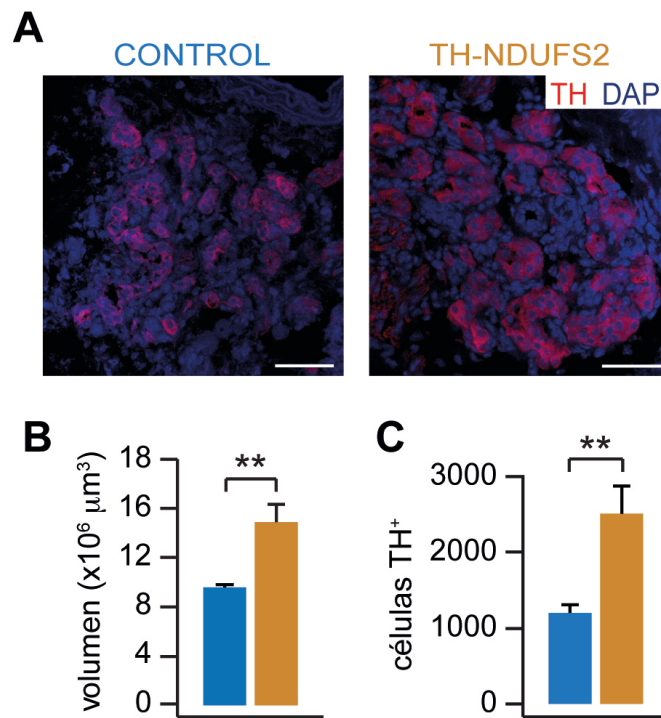


Figura 17. Análisis histológico del cuerpo carotídeo de los ratones TH-NDUFS2.

(A) Detección de TH mediante inmunofluorescencia en cortes histológicos de cuerpo carotídeo de ratones controles (azul) y TH-NDUFS2 (marrón) a P60. (B-C) Cuantificación del volumen (B) y del número de células TH⁺ (C) de los ratones controles (n=5) y TH-NDUFS2 (n=4). Barra de calibración: 50 μm . **p<0.01

A pesar de la disminución de la expresión de *Ndufs2* en los tejidos catecolaminérgicos del SNP, no se apreció un deterioro acusado en la estructura de estos tejidos. Es más, sorprendentemente, el CC de los ratones TH-NDUFS2 fue de mayor tamaño que el de los controles (Figura 17A) y tanto el volumen como el número de células TH⁺ fueron significativamente superiores en los TH-NDUFS2 que en los controles (Figura 17B). Por otro lado, la estructura del GCS estaba preservada en los animales TH-NDUFS2 (Figura 18A) y, tanto los controles como los KO, presentaron la misma densidad de

células TH⁺ (Figura 18B). Al igual que el GCS, la MA de los TH-NDUFS2 tampoco presentó diferencias significativas con respecto a los controles (Figura 18C-D), aunque en este tejido si se observó una tendencia hacia la disminución del volumen en los animales KO.

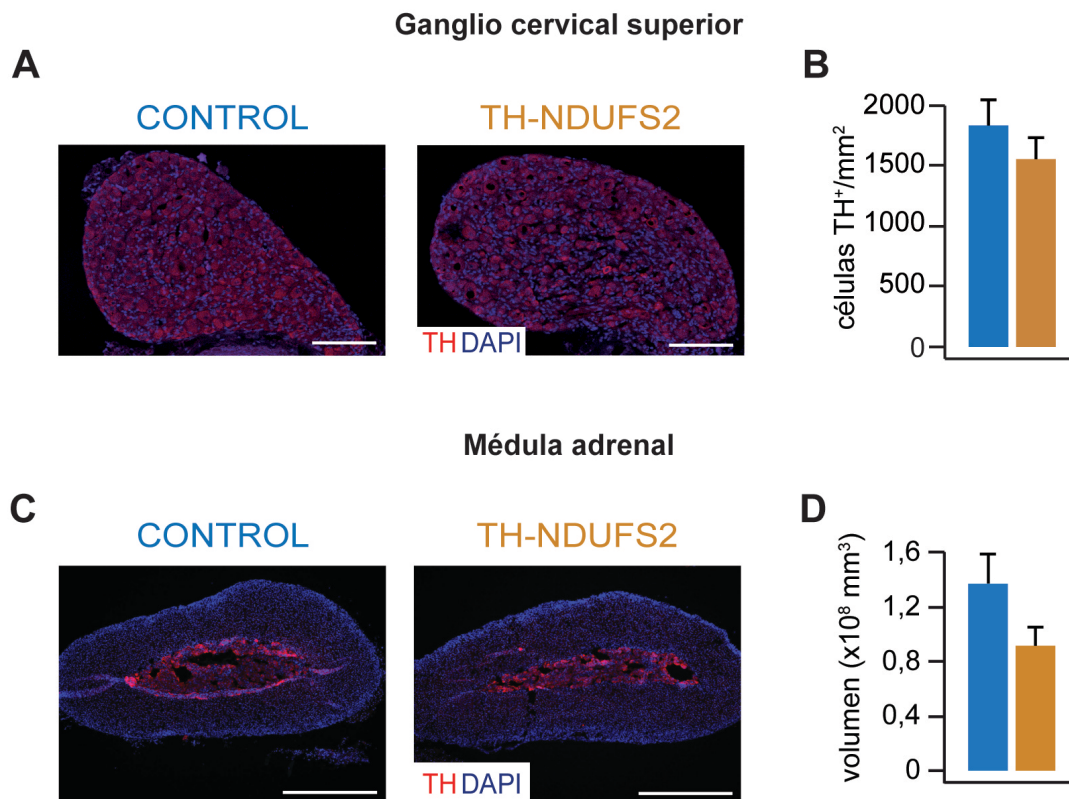


Figura 18. Análisis histológico de la médula adrenal y el ganglio cervical superior de los ratones TH-NDUFS2.

(A-B) Detección de TH mediante inmunofluorescencia y cuantificación de la densidad de células TH⁺ del ganglio cervical superior en controles (azul, n=4) y TH-NDUFS2 (marrón, n=4) a P60. (C-D) Detección de TH mediante inmunofluorescencia y cuantificación del volumen de la médula adrenal en controles (n=4) y TH-NDUFS2 (n=3) a P60. Barras de calibración: 500 μ m (A) y 150 μ m (B).

Para completar los datos histológicos que indicaban que la ausencia de la subunidad Ndufs2 no parece dañar a las células del CC, se llevó a cabo un análisis ultraestructural mediante la técnica de microscopía electrónica de transmisión, que permite observar con gran detalle orgánulos subcelulares. Estos estudios muestran que las células glómicas de los ratones TH-NDUFS2 mantienen la organización en glomérulos característica del CC (Biscoe and

Stehbens, 1966) y, la mayoría, conservan un aspecto sano (Figura 19A). No obstante, las células mutantes presentaron algunas anomalías con respecto a las controles. Las células glómicas procedentes de animales TH-NDUFS2 contienen menor número de vesículas catecolaminérgicas de centro denso (Figura 19B) y un incremento en la cantidad y/o tamaño de las mitocondrias (Figura 19C), lo cual sugiere que la ausencia de la subunidad Ndufs2 produce degranulación parcial y aumento de la biogénesis mitocondrial en las células glómicas.

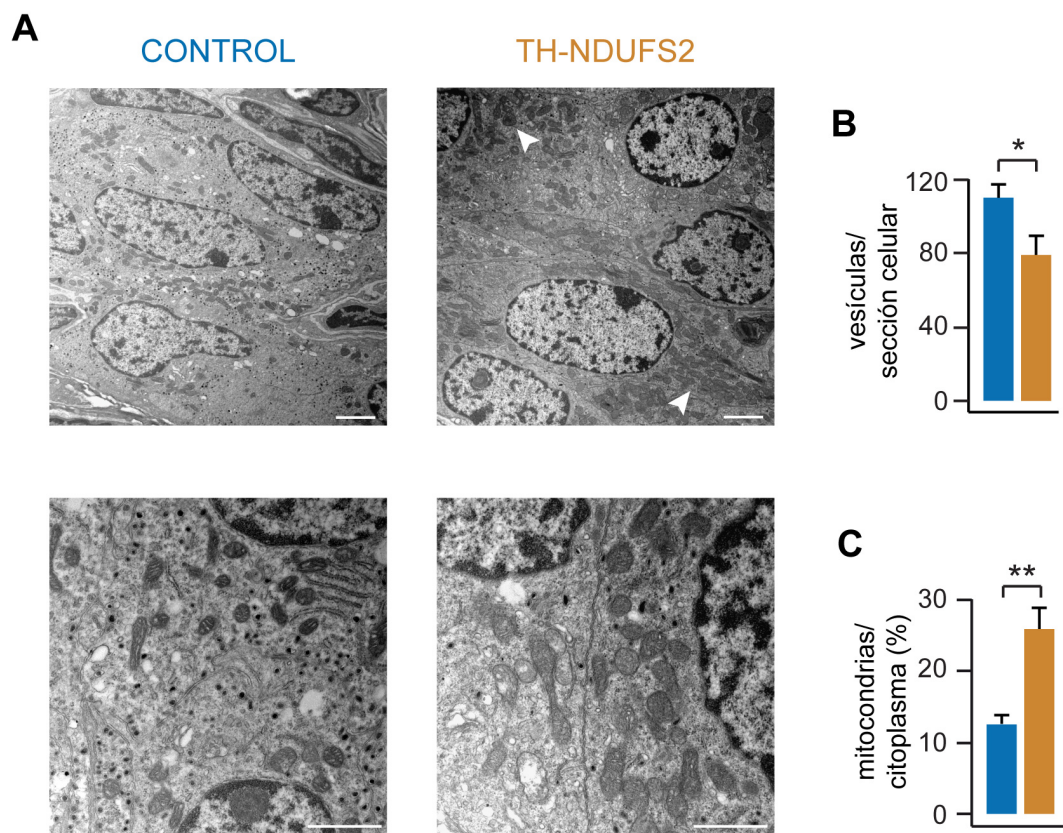


Figura 19. Estudio ultraestructural de las células glómicas TH-NDUFS2.

(A) Micrografías de células glómicas controles (azul) y TH-NDUFS2 (marrón) mostrando la organización de las células glómicas en glomérulos (superior) y sus mitocondrias y vesículas con mayor detalle (inferior). (B,C) Cuantificación de las vesículas (B) y la superficie mitocondrial (C). n=3/grupo; barras de calibración: 2 μ m (A) y 1 μ m (B). * $p < 0,05$

2.3. Niveles de ATP en órganos simpatoadrenales

Una vez analizadas las consecuencias de la ablación de *Ndufs2* sobre la estructura de los tejidos catecolaminérgicos del SNP, se investigó qué repercusiones tenía esta mutación en la función mitocondrial del CC, el GCS y la MA. Para ello se midieron los niveles ATP en estos tejidos ya que la alteración de la CTE debería reflejarse en la producción de ATP. El contenido de ATP del CC y el GCS fue similar en todos los grupos de animales estudiados (Figura 20A-B). Tan solo en la MA de los ratones TH-NDUFS2 se produjo una disminución significativa del nivel de ATP con respecto a los controles (Figura 20C). Estos datos concuerdan con el análisis histológico previo, mostrando que la función mitocondrial se afectó más en aquellos tejidos que presentaron peor estado. Podemos concluir que el CC es resistente a la carencia de la subunidad *Ndufs2* del CMI mientras que la MA es más susceptible.

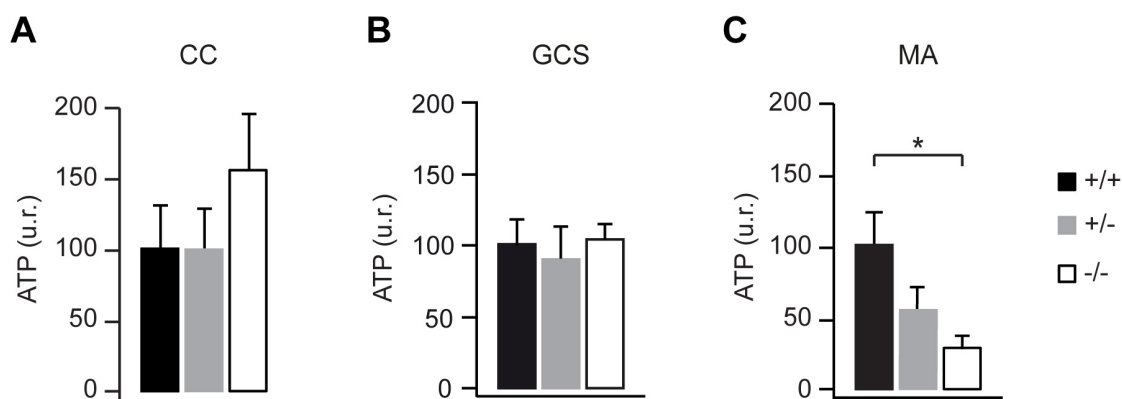


Figura 20. Análisis de la cantidad de ATP en tejidos TH⁺ del sistema nervioso periférico de los ratones TH-NDUFS2.

Comparación de los niveles de ATP en cuerpo carotídeo (CC; A), ganglio cervical superior (B) y médula adrenal MA (C) de ratones controles (+/+), heterocigotos (+/-) y mutantes (-/-). n=10-12/grupo; u.r.: unidades relativas. *p<0,05

2.4. Respuesta ventilatoria a la hipoxia

Dado que el objetivo fundamental de este trabajo es investigar el efecto de las mutaciones en el CMI sobre las respuesta aguda a la hipoxia, el primer experimento funcional llevado a cabo en los ratones TH-NDUFS2 fue el análisis

de la “respuesta ventilatoria a la hipoxia” (RVH; ver “Introducción”), un reflejo que depende fundamentalmente de la integridad funcional del CC (Macias et al., 2014; Timmers et al., 2003). Los animales se sometieron a una prueba plestismográfica que permite controlar y modificar la tensión de O_2 en la que se encuentran los animales y medir su frecuencia respiratoria. En animales controles, la disminución en la tensión de O_2 en la cámara de registro produjo un aumento progresivo de la frecuencia respiratoria que se recuperó al volver a la condición de normoxia (Figura 21A). Por el contrario, los ratones TH-NDUFS2 se mostraron notablemente insensibles a los cambios en tensión de O_2 ambiental; su frecuencia respiratoria se mantuvo prácticamente constante a lo largo de toda la prueba plestismográfica (Figura 21B). A pesar de las diferencias en la RVH, los ratones controles y TH-NDUFS2 no presentaron

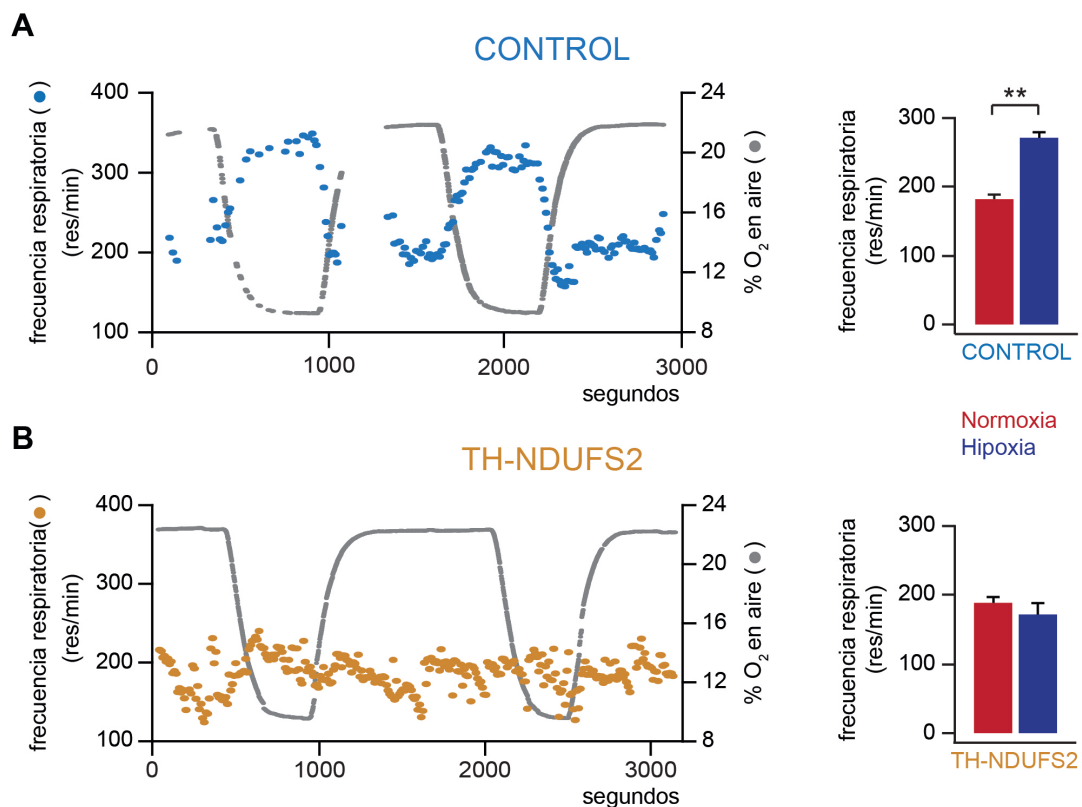


Figura 21. Respuesta hiperventilatoria a hipoxia de ratones los TH-NDUFS2.

(A) Registro de plestismografía representativo de ratones controles ilustrando los cambios de la frecuencia respiratoria durante los periodos de normoxia (~21% O_2) e hipoxia (~10% O_2) (n=11). (B) Registro de plestismografía representativo de ratones TH-NDUFS2; nótese que la frecuencia respiratoria no varía entre los periodos de normoxia (~21% O_2) e hipoxia (~10% O_2) (n=9). ** $p < 0,01$

diferencias significativas en la frecuencias respiratoria basal, medida en condiciones de normoxia. Los datos pletismográficos indican que la delección de la subunidad Ndufs2 anula la RVH, posiblemente por alteración de la función quimiosensora de O₂ de las células glómicas del CC.

2.5. Propiedades funcionales de las células glómicas de animales controles y TH-NDUFS2

Con objeto de mostrar si la supresión de la RVH en los ratones TH-NDUFS2 se debe a alteraciones funcionales de las células glómicas se analizaron las distintas etapas de la ruta de quimiotransducción del estímulo hipóxico: secreción de catecolaminas, incremento de la concentración de calcio intracelular y regulación de las corrientes de K⁺ (ver “Introducción”).

2.5.1. Respuesta secretora a la hipoxia

La secreción de neurotransmisores por las células glómicas es el último paso de la ruta de quimiotransducción que conduce a la activación de las fibras aferentes de los nerviosos sensoriales que, a su vez, estimulan a las neuronas respiratorias del tronco del encéfalo. Por ello, se estudió la capacidad secretora de las células glómicas de los animales TH-NDUFS2 mediante la técnica de amperometría en la preparación de rodajas de CC, que mantiene en gran medida su organización en glomérulos y es, por tanto, una aproximación más

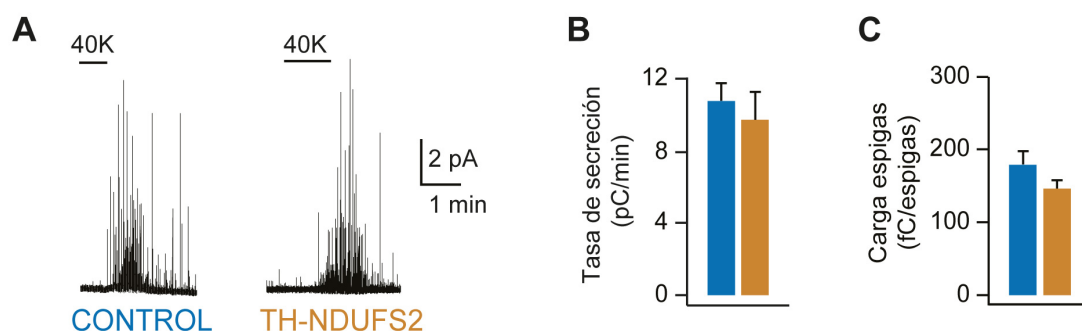


Figura 22. Capacidad secretora de las células glómicas TH-NDUFS2.

(A) Registros amperométricos representativos de la respuesta a alto potasio (40K) de células glómicas controles (azul) y TH-NDUFS2 (marrón). (B y C) Cuantificación de la

tasa de secreción (B) y la carga media de las espigas (C) en respuesta a 40K de células controles (n=36) y TH-NDUFS2 (n=21).

fisiológica para estudiar la función del CC ya que las células no son sometidas al tratamiento enzimático o la dispersión mecánica (Pardal et al., 2000). De acuerdo con el estudio histológico, las rodajas de CC de los animales TH-NDUFS2 presentaron mayor cantidad de glomérulos y con mejor aspecto que las rodajas de animales controles. Además, las células glómicas de los ratones TH-NDUFS2 mantuvieron una capacidad secretora normal ya que la estimulación con alto potasio (40 mM) desencadenó una respuesta de magnitud similar a la de los animales controles (Figura 22). La exposición a hipoxia ($PO_2 \sim 10$ mmHg), hipoglucemia (0 glucosa) o hipercapnia (20% CO_2) provocó una clara respuesta secretora en la mayoría de las rodajas de CC de animales controles (Figura 23A). Sin embargo, en las rodajas de CC de los ratones TH-NDUFS2 el efecto de la hipoxia desapareció pero el de la hipoglucemia o la hipercapnia se mantuvo, induciendo estos últimos una secreción de magnitud similar a la registrada en las rodajas controles (Figura 23B). En cuanto a la proporción de células que respondieron a hipercapnia e hipoglucemia, ésta fue similar en animales controles y TH-NDUFS2 pero, por el contrario, respondieron a hipoxia más del 90% de las rodajas controles frente a tan solo un 14% de las TH-NDUFS2 (Figura 23C). Además, la magnitud de la respuesta a hipoxia registrada en las pocas células mutantes que respondieron fue mucho menor que en las rodajas controles (Figura 23D). Una observación interesante es que, aunque los valores de secreción inducidos por la hipercapnia fueron similares en controles y TH-NDUFS2, por causas que todavía desconocemos la respuesta de estos últimos a hipoglucemia fue más potente (Figura 23E). En su conjunto, estos resultados indican que la capacidad secretora de las células glómicas no se ve afectada por la delección de *Ndufs2*. Sin embargo, esta mutación abole selectivamente la sensibilidad a los cambios de PO_2 .

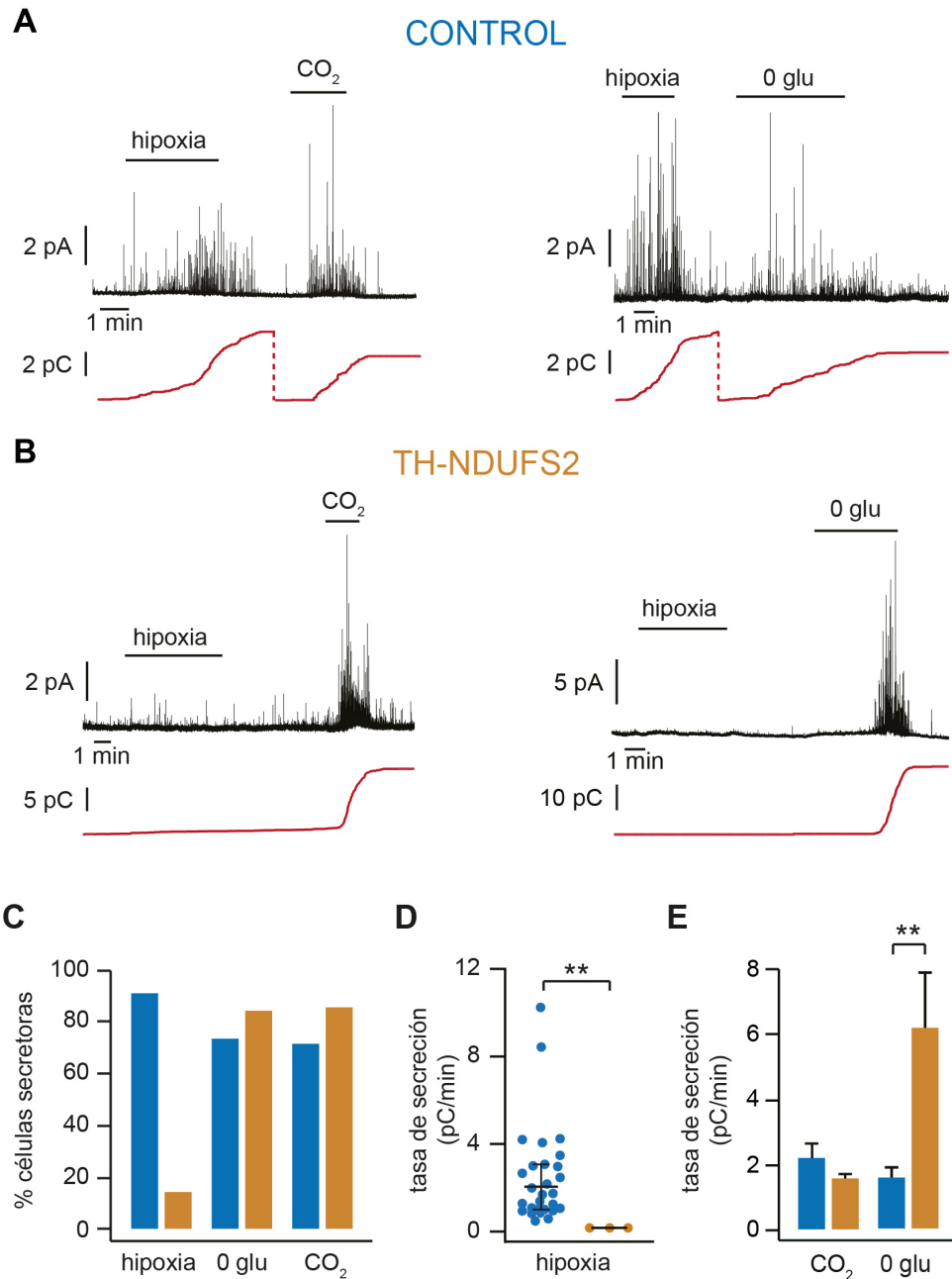


Figura 23. Respuesta secretora de las células glómicas de ratones controles y TH-NDUFS2 a hipoxia, hipoglucemia e hipercapnia.

(A-B) Registros amperométricos representativos de rodajas de cuerpo carotídeo controles (A, azul) y TH-NDUFS2 (B, marrón). La línea roja bajo los registros representa la secreción acumulada; la línea discontinua indica el reinicio del integrador. (C) Porcentaje de células que respondieron a hipoxia, hipoglucemia (0 glu) e hipercapnia (CO₂) en rodajas controles (n=33, 11 y 7, respectivamente) y TH-NDUFS2 (n=21, 14 y 12, respectivamente). (D) Gráfico de dispersión de la tasa de secreción en respuesta a hipoxia de células controles (n=33) y TH-NDUFS2 (n=3). (E) Tasa de secreción en respuesta a hipercapnia e hipoglucemia en células controles (n=11 y 5, respectivamente) y TH-NDUFS2 (n=14 y 12, respectivamente). **p<0,01

2.5.2. Cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelular

La secreción de catecolaminas en las células glómicas del CC es dependiente de la entrada de Ca^{2+} desde el exterior celular a través de canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes (Buckler and Vaughan-Jones, 1994; Montoro et al., 1996; Urena et al., 1994). Dado que en las células glómicas de los ratones TH-NDUFS2 no se detectó secreción en respuesta a hipoxia, se investigó si tampoco se producía un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$) frente dicho estímulo. Para estudiar este paso de la ruta de quimiotransducción se empleó la preparación de células dispersas de CC cargadas con el indicador de calcio intracelular Fura-2AM. La exposición de las células glómicas controles a hipoxia, hipoglucemia e hipercapnia, produjo un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ (Figura 24A). Sin embargo, en las células

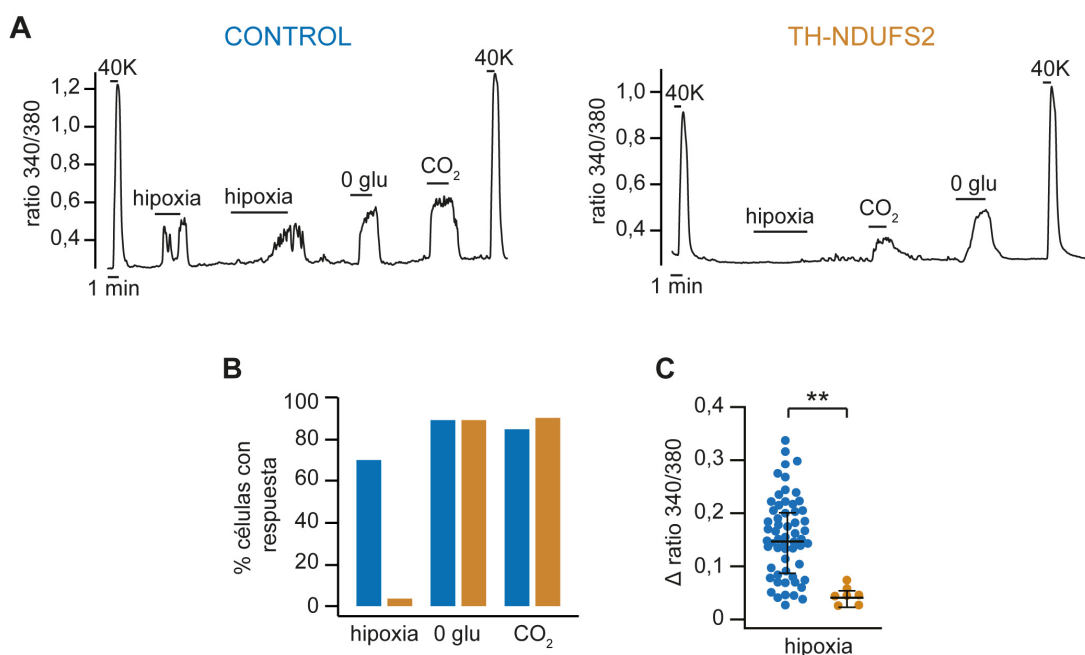


Figura 24. Aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular de las células glómicas de ratones controles y TH-NDUFS2 en respuesta a hipoxia, hipoglucemia e hipercapnia.

(A) Registros representativos de los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ en células controles (azul) y TH-NDUFS2 (marrón). (B) Porcentaje de células controles (n=84) y TH-NDUFS2 (n=164) que respondieron a hipoxia, hipoglucemia (0 glu) e hipercapnia (CO_2). (C) Incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ al someter a hipoxia las células controles (n=59) y TH-NDUFS2 (n=7). **p<0,01

TH-NDUFS2 este incremento se registró en condiciones de hipoglucemia e hipercapnia pero no en hipoxia. Al igual que se observó en los experimentos de amperometría, la proporción de células glómicas que respondieron a hipercapnia e hipoglucemia fue similar en ratones controles y TH-NDUFS2 (Figura 24C). Por el contrario, se observó un incremento de la $[Ca^{2+}]_{in}$ en respuesta a hipoxia en más del 70% de las células controles frente a tan solo el 4% de las células TH-NDUFS2. Además, la magnitud de dicho incremento fue significativamente menor en las células mutantes que en las controles (Figura 24D). Estos datos muestran que la ausencia de respuesta secretora a la hipoxia en las células glómicas deficientes en Ndufs2 se debe a la ausencia de incremento de la $[Ca^{2+}]_{in}$ frente a este estímulo de forma selectiva.

2.5.3. Características electrofisiológicas

Los resultados obtenidos con las técnicas amperométricas y microfluorimétricas mostraron una desaparición selectiva de la respuesta a hipoxia en las células glómicas TH-NDUFS2, lo que sugería que el proceso básico de quimiotransducción está alterado en este modelo animal. Dado que la inhibición de canales de K^+ por la hipoxia es la etapa inicial en la transducción sensorial en el cuerpo carotídeo (Lopez-Barneo, 2003), procedimos al estudio electrofisiológico de las células controles y mutantes. Los experimentos se llevaron a cabo en células dispersas empleando la técnica de *patch-clamp*, en las configuraciones de *whole-cell* y parche perforado (ver “Materiales y Métodos”).

2.5.3.1. Parámetros electrofisiológicos y corrientes iónicas

Los parámetros electrofisiológicos más importantes de las células glómicas controles y TH-NDUFS2 en condiciones de normoxia (21% O_2) se muestran en la tabla 6. Los valores de capacidad de ambos tipos celulares fueron similares, así como la corriente *background* de Na^+ y las corrientes voltaje-dependientes de Na^+ , Ca^{2+} y K^+ (Figura 25). No obstante, se observó una disminución de la amplitud de la corriente de Ca^{2+} que no fue estadísticamente significativa. A pesar de las semejanzas antes citadas, se

Tabla 6. Comparación de parámetros electrofisiológicos de las células glómicas controles y TH-NDUFS2.

	CONTROL (Whole-cell)	TH-NDUFS2 (Whole-cell)	CONTROL (Anfotericina)	TH-NDUFS2 (Anfotericina)
Capacidad celular (pF)	3,46 ± 0,17 (25)	3,75 ± 0,25 (25)	-	-
Resistencia de entrada (Gohm)	1,35 ± 0,15 (25)	4,41 ± 0,61** (26)	2,30 ± 0,32 (27)	10,8 ± 2,11** (24)
Potencial de membrana (mV)	-	-	- 56,50 ± 2,95 (14)	- 40,91 ± 2,28* (10)
I_{Na} <i>background</i> (pA)	-	-	14,25 ± 4,06 (12)	12,52 ± 1,97 (7)
Potencial de reversión (mV)	-	-	- 66,4 ± 2,66 (21)	- 49,7 ± 3,41** (24)

Los datos se presentan como los valores medios ± error estándar; el número de células registrados se muestra entre paréntesis. *p<0.05; **p<0.01

registraron también diferencias en las corrientes de células controles y TH-NDUFS2 estudiadas aplicando un protocolo de rampa despolarizante, el cual permite analizar las corrientes a lo largo de un amplio rango de potenciales de membrana (desde -90 mV hasta -10 mV). La corriente *background* de las células TH-NDUFS2 fue significativamente menor que en las controles (Figura 26A-B), lo cual se tradujo en un aumento de la resistencia de entrada (Figura 26D), parámetro que es inversamente proporcional a la amplitud de la corriente *background* o *leakage*. Por otro lado, la amplitud de la corriente de salida voltaje-dependiente, mediada por canales de K^+ , también fue significativamente menor en células TH-NDUFS2 (Figura 26A-C). Además, el protocolo de rampa despolarizante mostró que el potencial de reversión de las células mutantes estaba desplazado hacia valores más despolarizados del potencial de membrana (Tabla 6, Figura 26A). De acuerdo con esta observación, los registros con la configuración de *current-clamp* mostraron que las células mutadas tienen un potencial de reposo de ~14 mV más despolarizado que las controles (Tabla 6). Estos datos indican que la delección de *Ndufs2* resulta en inhibición de la conductancia a iones K^+ y una despolarización de las células. Como se discute más adelante, este fenotipo electrofisiológico se debe a

alteraciones en los mecanismos electrofisiológicos modulados por los cambios de PO_2 .

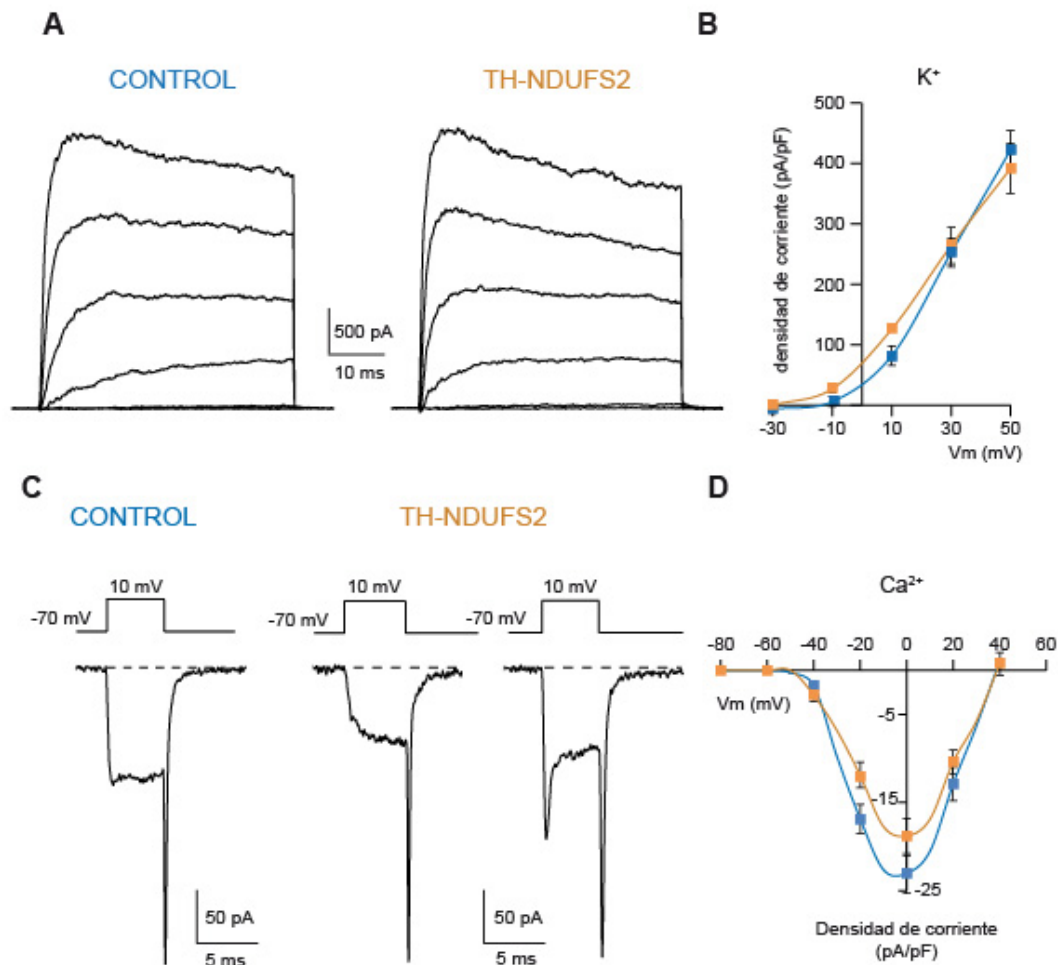


Figura 25. Corrientes de Na⁺, Ca²⁺ y K⁺ voltaje-dependientes de las células glómicas de ratones controles y TH-NDUFS2.

(A) Registros representativos de corrientes de K⁺ de células glómicas controles (azul) y TH-NDUFS2 (marrón). Se aplicaron pulsos despolarizantes (50 ms) secuenciales desde -30 mV hasta +50 mV, desde un potencial de reposo de -70mV. (B) Relación entre la densidad de corriente de K⁺ (pA/pF) y el potencial de membrana (V_m) en células glómicas controles (n=25) y TH-NDUFS2 (n=19). (C) Registros representativos de corrientes macroscópicas de Na⁺ y Ca²⁺ durante un pulso despolarizante a +10 mV desde -70 mV (D) Relación entre la densidad de corriente de Ca²⁺ (pA/pF) y el potencial de membrana (V_m) en células glómicas controles (n=25) y TH-NDUFS2 (n=19).

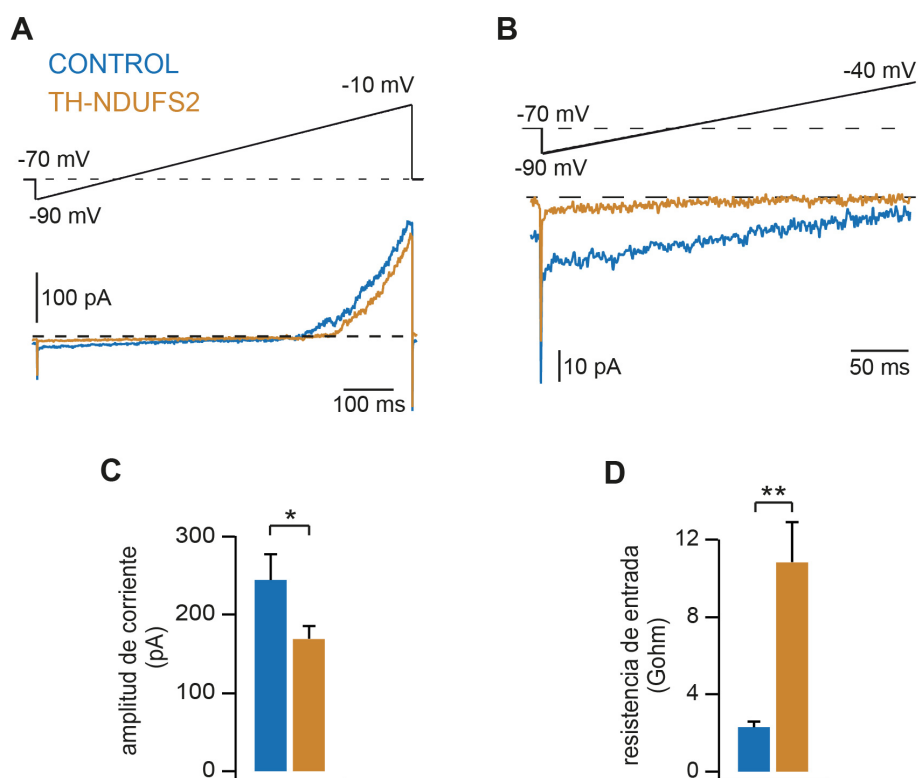


Figura 26. Corrientes iónicas de las células glómicas de animales controles y TH-NDUFS2.

(A, superior) Protocolo de rampa de voltaje aplicado a las células glómicas para estudiar las corrientes con la técnica de parche perforado. (A, inferior) Corrientes registradas en células controles (azul) y TH-NDUFS2 (marrón). (B) Comparación de las corrientes *leakage* de las células controles y TH-NDUFS2. Mismo registro que en A. (C) Comparación de la amplitud de la corriente a -10 mV de células controles (n=27) y TH-NDUFS2 (n=24). (D) Comparación de la resistencia de entrada en células controles (n=27) y TH-NDUFS2 (n=24). *p<0,05; **p<0,01

2.5.3.2. Regulación por hipoxia de las corrientes de K⁺

Los cambios producidos por la hipoxia en las corrientes iónicas de las células glómicas se analizaron inicialmente con el protocolo de rampa despolarizante descrito en el apartado anterior. Se observó una corriente *leakage* de entrada desde -90 hasta -50 mV aproximadamente, mediada fundamentalmente por canales de fuga o *background*, seguida de una corriente de salida a valores más despolarizados del potencial de membrana (Figura 27A-B). La corriente de salida se debió fundamentalmente a la activación de los canales de K⁺ voltaje-dependientes. Con este protocolo experimental las corrientes de entrada mediada por canales de Na⁺ y Ca²⁺ voltaje-dependientes

tienen una amplitud muy pequeña debido a la inactivación de los canales responsables de las mismas. En las células controles sometidas a hipoxia, la amplitud de la corriente de K^+ voltaje-dependiente se redujo de forma reversible, ya que al volver a la condición de normoxia (recuperación), la amplitud de esta corriente aumentó de nuevo hasta su valor original (Figura 27B superior y 27C). El efecto modulador de la hipoxia sobre la corriente de K^+ voltaje-dependiente estudiado en numerosos laboratorios (Ganformina and Lopez-Barneo, 1992; Lopez-Lopez et al., 2003; Patel and Honore, 2001; Perez-Garcia et al., 2004) no se observó en las células TH-NDUFS2. Efectos similares a los obtenidos con el protocolo de rampas de potencial se

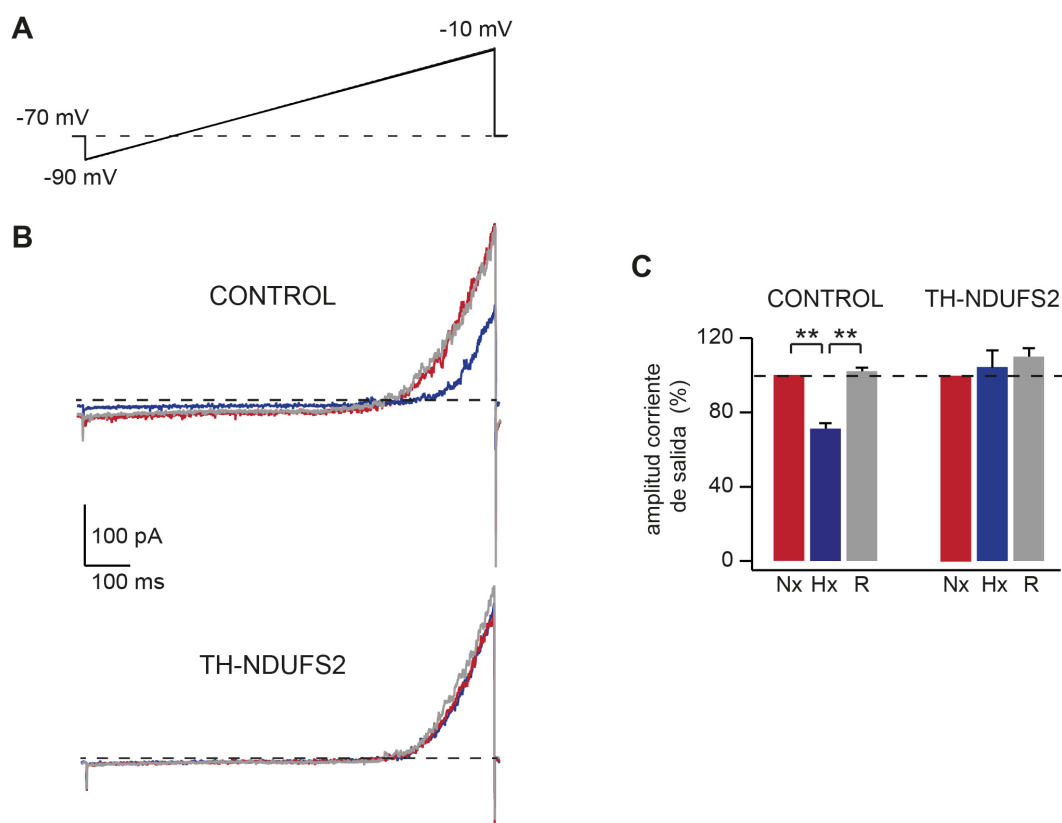


Figura 27. Regulación de la corriente de K^+ voltaje-dependiente por hipoxia.

(A) Protocolo de rampa despolarizante aplicado a las células glómicas dispersas registradas con la técnica de parche perforado. (B) Corrientes registradas en células controles y TH-NDUFS2 en condiciones de normoxia (rojo), hipoxia (azul) y recuperación tras volver a normoxia (gris). (C) Cuantificación de la amplitud de la corriente de K^+ (a -10 mV) normalizada con respecto a la condición de normoxia en células controles (n=21) y TH-NDUFS2 (n=19). La línea discontinua indica el 100% del valor empleado para normalizar. **p<0,01

observaron en experimentos en los que los canales de K^+ se activaron mediante la aplicación de pulsos despolarizantes. La figura 28A ilustra cómo la hipoxia produjo una inhibición reversible de la amplitud de la corriente de K^+ de ~20% en células controles que se abolió en células procedentes de animales TH-NDUFS2. Por el contrario, la regulación de las corrientes por hipercapnia se mantuvo sin cambios (Figura 28B).

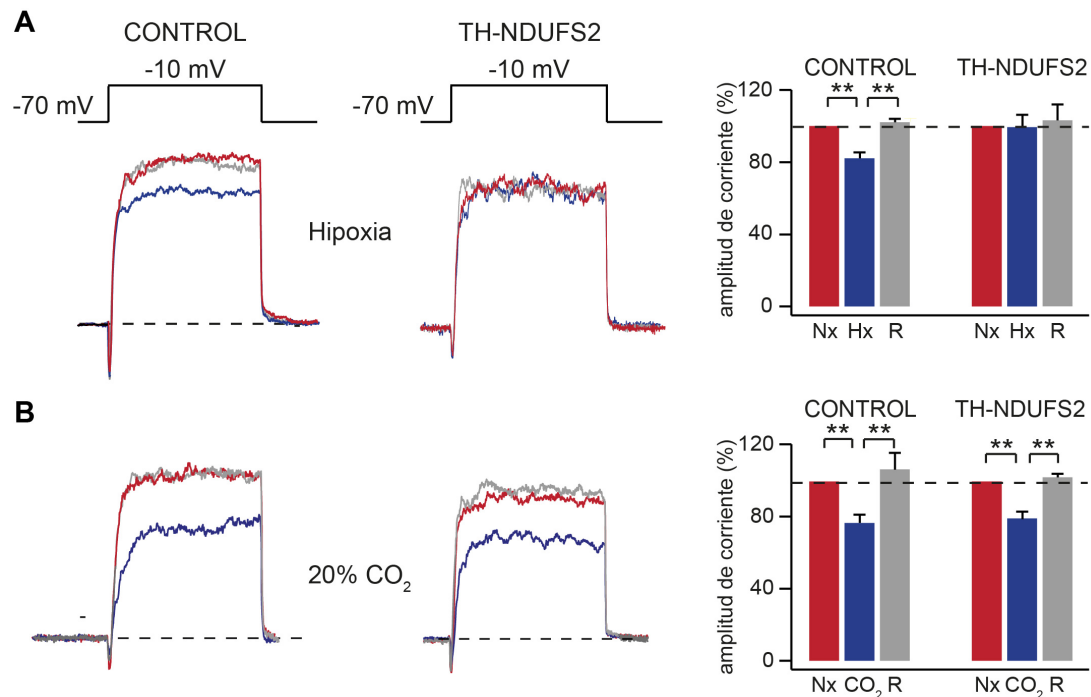


Figura 28. Regulación de la corriente de K^+ por hipoxia e hipercapnia en células glómicas de animales controles y TH-NDUFS2.

(A) Efecto de la hipoxia sobre las corrientes macroscópicas de K^+ registradas al despolarizar células hasta -10 mV. El diagrama de barras a la derecha muestra la cuantificación del pico de amplitud de la corriente de K^+ en células controles (n=13) y TH-NDUFS2 (n=10). Normoxia (rojo), hipoxia (azul) y recuperación (gris). (B) Efecto de la hipercapnia sobre las corrientes macroscópicas de K^+ . El diagrama de barras a la derecha muestra la cuantificación del pico de amplitud de la corriente de K^+ en células controles (n=10) y TH-NDUFS2 (n=9). Normoxia (rojo), hipercapnia (azul) y recuperación (gris). La línea discontinua indica el 100% del valor empleado para normalizar. **p<0,01

Al igual que ocurrió con la corriente de K^+ voltaje-dependiente, la hipoxia produjo una inhibición reversible de la corriente *leakage* (incremento de la resistencia de entrada) que no se observó en las células glómicas procedentes de animales TH-NDUFS2 (Figura 29A-C). Estos resultados

muestran que aunque las células glómicas deficientes de *Ndufs2* tienen canales iónicos funcionales muy similares a los de las controles, las primeras poseen un fenotipo electrofisiológico característico y han perdido la capacidad de modular la conductancia a K^+ (mediada por canales *leakage* y voltaje-dependientes) por la tensión de O_2 . Los datos electrofisiológicos explican la falta de respuesta de las células TH-NDUFS2 en los experimentos de amperometría y microfluorimetría. La ausencia de respuesta electrofisiológica a la hipoxia en las células glómicas impide la entrada de Ca^{2+} y el incremento de actividad secretora desencadenante de la ruta de quimiotransducción que, finalmente, induce la RVH.

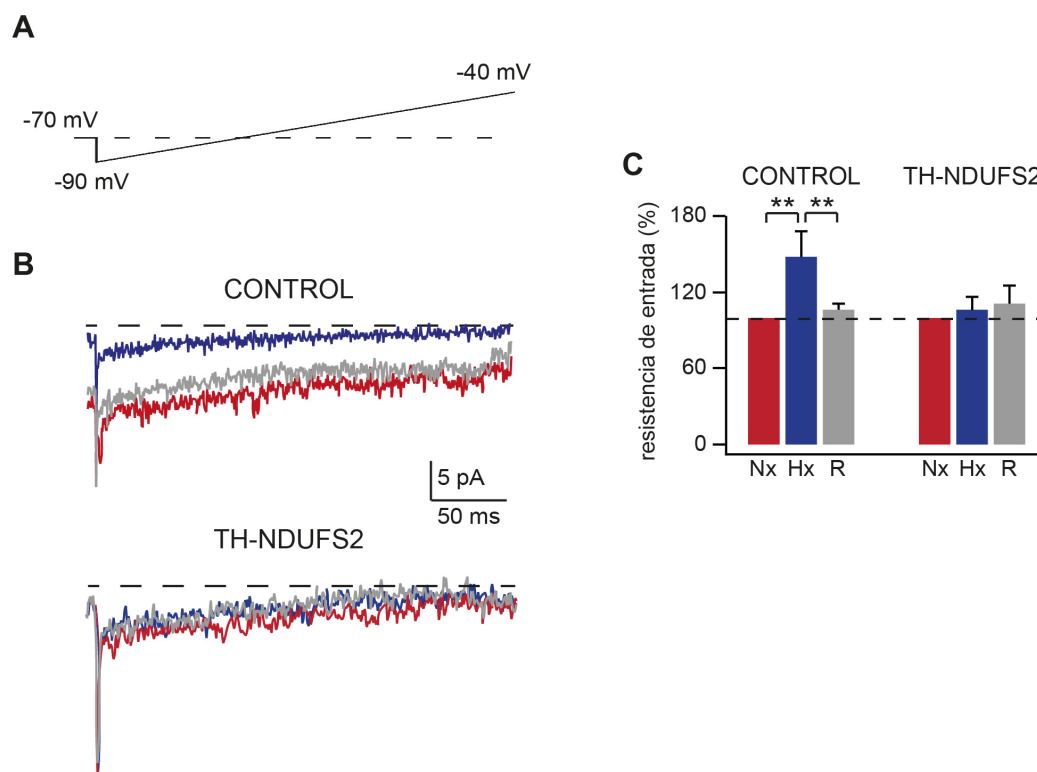


Figura 29. Regulación por hipoxia de la corriente *leakage* de K^+ en las células glómicas controles y TH-NDUFS2.

(A) Protocolo de rampa despolarizante aplicado a las células glómicas. (B) Registros de corriente *leakage* en células controles y TH-NDUFS2 sometidas a normoxia (rojo), hipoxia (azul) y recuperación (gris). Los registros son los mismos que los representados en la figura 11. (C) Cuantificación de la resistencia de entrada normalizada con respecto a la condición de normoxia en células controles (n=21) y TH-NDUFS2 (n=19). La línea discontinua indica el 100% del valor empleado para normalizar. **p<0,01

3. Estudio de los ratones ESR-NDUFS2

3.1. Tratamiento y evolución de la línea ESR-NDUFS2

El modelo de ratón ESR-NDUFS2 se generó para estudiar el efecto de delecionar *Ndufs2* en la edad adulta y de forma ubicua. Esto último permitió realizar estudios bioquímicos que requieren una cantidad de tejido muy superior a la que puede obtenerse del CC, el GCS o incluso la MA. Los ratones ESR-NDUFS2 se trataron con TMX al alcanzar los 2 meses de edad (Figura 30A). A partir de la séptima semana desde el inicio del tratamiento con TMX, el deterioro de los ratones ESR-NDUFS2 fue evidente, presentando una pérdida de peso significativa (Figura 30B). En este trabajo nos centramos en el estudio de los cambios en la sensibilidad a la hipoxia producidos por la pérdida del gen *Ndufs2*. Al igual que se indicó en la descripción del modelo TH-NDUFS2, no se han tratado en este trabajo otras alteraciones sistémicas ni las causas de la muerte de los animales, que suponemos relacionadas con alteraciones pleiotrópicas (renales, metabólicas y cardíacas, entre otras) debidas a la disfunción mitocondrial.

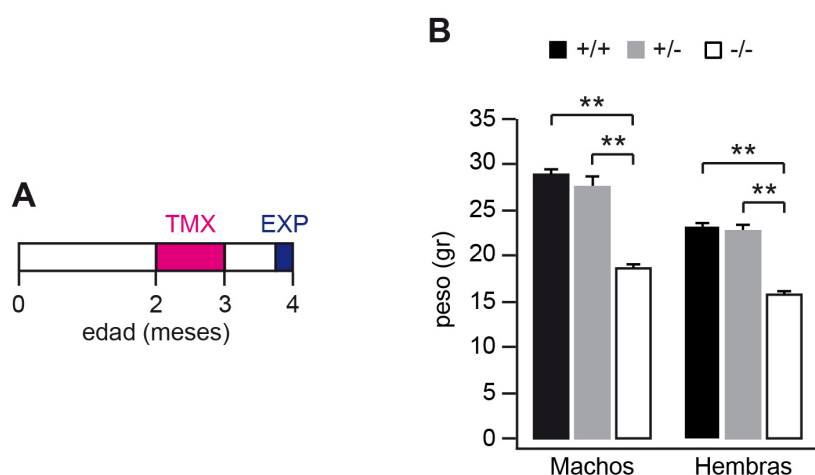


Figura 30. Tratamiento y evolución de los ratones ESR-NDUFS2.

(A) Diseño experimental empleado para la línea de ratones ESR-NDUFS2. Tratamiento con dieta con tamoxifeno (TMX; rosa); realización de experimentos y sacrificio (EXP; azul). (B) Peso de los ratones controles (+/+), heterocigotos (+/-) y KO (-/-) a las 7 semanas tras el inicio del tratamiento con TMX. n=19-32/grupo. **p<0,01

3.2 Niveles de ARNm y proteína Ndufs2

En los ratones ESR-NDUFS2 se estudiaron los mismos tejidos catecolaminérgicos del SNP (CC, GCS y AM) que en el modelo TH-NDUFS2. El análisis de expresión génica mediante PCR cuantitativa mostró que en los ratones ESR-NDUFS2 homocigotos la expresión de *Ndufs2* desapareció casi por completo sin que se produjese una compensación por parte del CMII, tal y como indican los datos de expresión de *Sdhb* (Figura 31). Por lo tanto, estos datos replicaron los resultados obtenidos previamente en los ratones TH-NDUFS2. En paralelo, se estudió la estructura del CC, el GCS y la MA y, en contraste con lo observado en los ratones TH-NDUFS2, ninguno de estos tejidos pareció afectarse por la delección de *Ndufs2*. Respecto al CC, tanto el volumen como el número de células TH⁺ de los ratones ESR-NDUFS2 fueron similares al de los controles (Figura 32A) y tampoco se observaron diferencias en la densidad de células TH⁺ del GCS ni en el volumen de la MA (Figura 32B-C). La apariencia normal de estos tejidos en los ratones ESR-NDUFS2 podría deberse a una cierta resistencia de las células del SNP a la falta de CMI y a que, tras la delección del gen *Ndufs2*, los animales se utilizaron para los experimentos en una ventana temporal en la que todavía no había afectación de estas células.

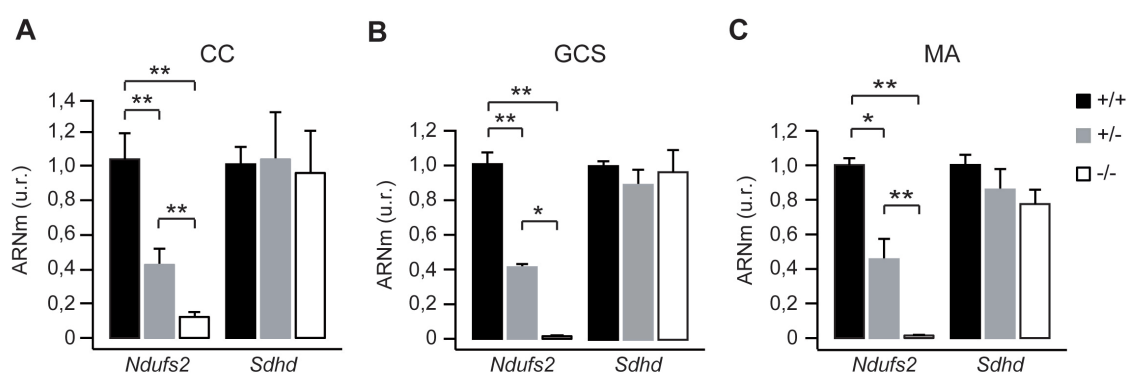


Figura 31. Nivel de ARNm de *Ndufs2* y *Sdhb* en tejidos catecolaminérgicos del sistema nervioso periférico de los ratones ESR-NDUFS2.

Cuerpo carotídeo (CC; A), ganglio cervical superior (GCS; B) y médula adrenal (MA; C). n=3-5/grupo. *p<0,05; **p<0,01

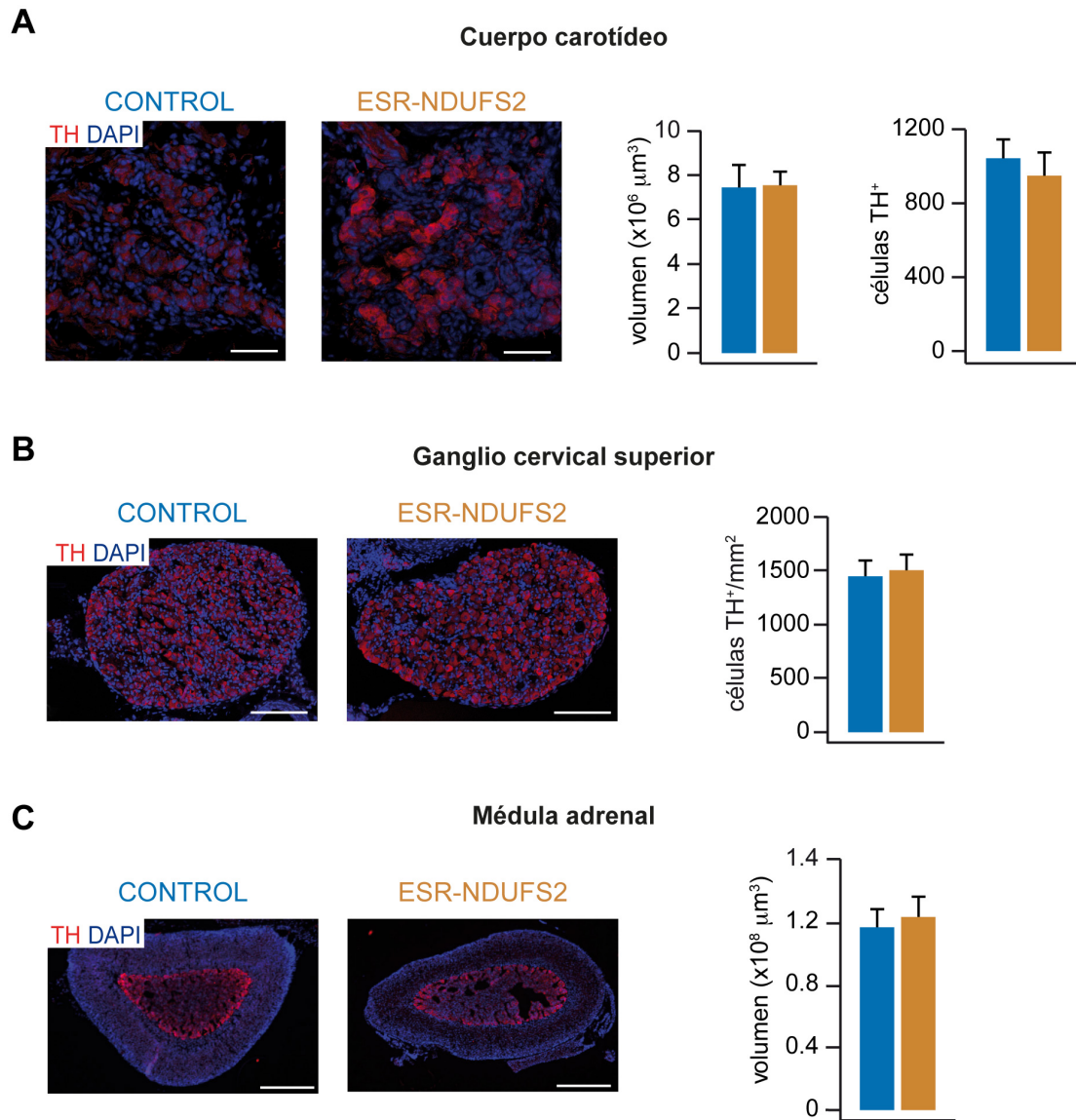


Figura 32. Análisis histológico de tejidos catecolaminérgicos del sistema nervioso periférico de los ratones ESR-NDUFS2.

(A) Detección de TH mediante inmunofluorescencia y cuantificación del volumen y número de células TH⁺ en controles (n=3) y TH-NDUFS2 (n=5).

(B) Detección de TH mediante inmunofluorescencia y cuantificación de la densidad de células TH⁺ del ganglio cervical superior en controles (n=4) y TH-NDUFS2 (n=4).

(C) Detección de TH mediante inmunofluorescencia y cuantificación del volumen de la médula adrenal en controles (n=4) y TH-NDUFS2 (n=5).

El modelo de animal ESR-NDUFS2 permitió estudiar, además de los tejido catecolaminérgicos del SNP, otros órganos para mostrar la delección generalizada de *Ndufs2* y realizar en ellos estudios bioquímicos sofisticados. Para este tipo de análisis utilizamos el riñón y el corazón, órganos con alta actividad oxidativa. En la figura 33 se muestra que en los ratones ESR-

NDUFS2 (-/-) la delección de *Ndufs2* fue muy efectiva en ambos órganos. Se aprecia la disminución marcada tanto de los niveles de ARNm (Figura 33A -B) como de la cantidad de proteína (Figura 33C-D) *Ndufs2*.

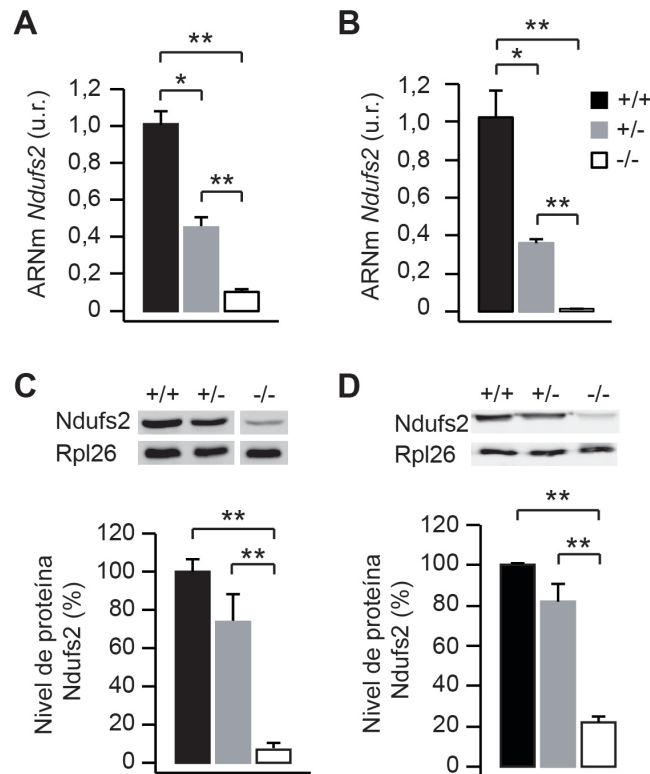


Figura 33. Nivel de ARNm y proteína en riñón y corazón de los ratones ESR-NDUFS2.

(A,B) Niveles relativos de ARNm de *Ndufs2* en riñón (A, n=4/grupo) y corazón (B, n=4/grupo). (C,D) Cantidades relativas de proteína *Ndufs2* en riñón (C, n=4/grupo) y corazón (D, n=3-4/grupo) expresadas como porcentaje del control (+/+). u.r.: unidades relativas. *p<0,05; **p<0,01

3.3. Análisis de la función mitocondrial

Los estudios de la función mitocondrial se llevaron a cabo en riñón y corazón ya que, como se mencionado anteriormente, no fue posible realizarlos en los tejidos catecolaminérgicos del SNP debido a su pequeño tamaño. En primer lugar, se midió la actividad de los complejos I y II mitocondriales. La actividad del CMI disminuyó en los animales ESR-NDUFS2 flox/- tratados con tamoxifeno (-/-) con respecto a los controles tanto en riñón como en corazón (Figura 34A-B). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre controles y ratones ESR-NDUFS2 en la actividad del CMII, lo cual indica que la

ausencia de Ndufs2 provoca la disfunción del CMI sin alterar la actividad del CMII.

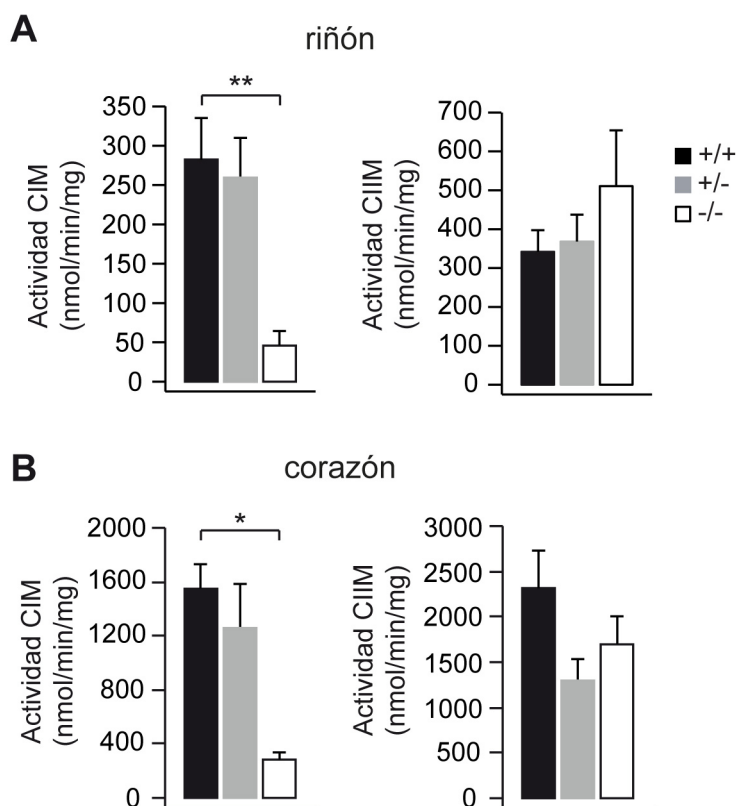


Figura 34. Determinación de la actividad de los complejos I y II mitocondriales en riñón y corazón de los ratones ESR-NDUFS2.

Actividad del CMI y CMII en extractos mitocondriales de riñón (A, n=4-8/grupo) y corazón (B, n=4-8/grupo). *p<0,05; **p<0,01

La tasa de consumo de O₂ dependiente de la actividad de los complejos I y II mitocondriales se investigó empleando extractos mitocondriales de riñón. El consumo de O₂ debido al CMI se estudió añadiendo malato y piruvato como sustratos, ya que al oxidarse producen NADH disponible para el CMI. Con estos sustratos no se detectó consumo de O₂ en los ensayos de los ratones ESR-NDUFS2 pero sí en los de ratones controles (Figura 35A). Sin embargo, la adición de succinato, sustrato del CMII, produjo una caída en la concentración de O₂ de magnitud similar en extractos controles y ESR-NDUFS2. Estos resultados apoyan la observación de que la falta de la subunidad Ndufs2 afecta severamente a la función del CMI sin que se produzca una compensación por parte del CMII (Figura 35B) (ver “apartado 5” más adelante).

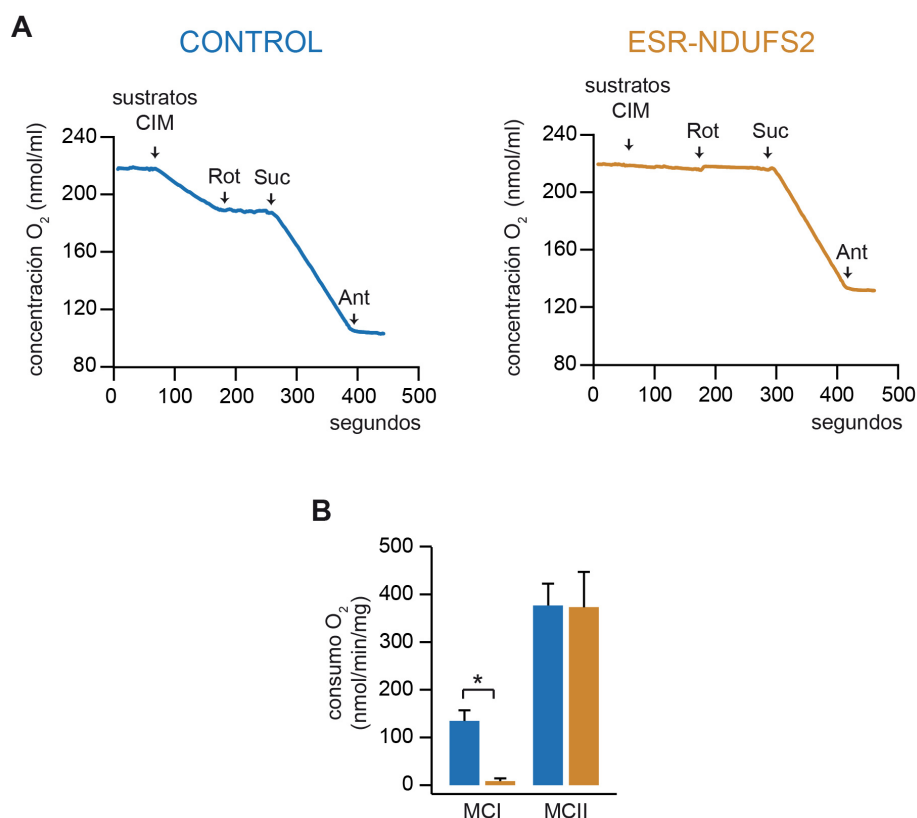


Figura 35. Determinación del consumo de oxígeno dependiente de los complejos I y II mitocondriales en el modelo ESR-NDUFS2.

(A) Registros representativos del consumo de O₂ dependiente del CMI y CMII en extractos mitocondriales de riñón de ratones controles (azul) y ESR-NDUFS2 (marrón). (B) Tasa de consumo de O₂ en controles y ESR-NDUFS2 (n=3-5/grupo). Rot: rotenona; Suc: succinato; Ant: antimicina. *p<0,05

3.4. Respuesta ventilatoria a la hipoxia

Como se describió anteriormente para el modelo TH-NDUFS2, el efecto de la delección de *Ndufs2* sobre la función respiratoria de los animales ESR-NDUFS2 se estudió mediante pletismografía. La disminución de la tensión de O₂ produjo un incremento rápido y claro en la frecuencia respiratoria de los ratones controles (Figura 36A) mientras que no produjo ningún efecto en los animales ESR-NDUFS2 (Figura 60B). Por tanto, al igual que los ratones TH-NDUFS2, los ratones ESR-NDUFS2 fueron incapaces de mostrar respuesta ventilatoria a la hipoxia, lo que indica que la disfunción del CMI afecta a la sensibilidad al O₂ en los animales independientemente del momento del desarrollo en el que se produzca.

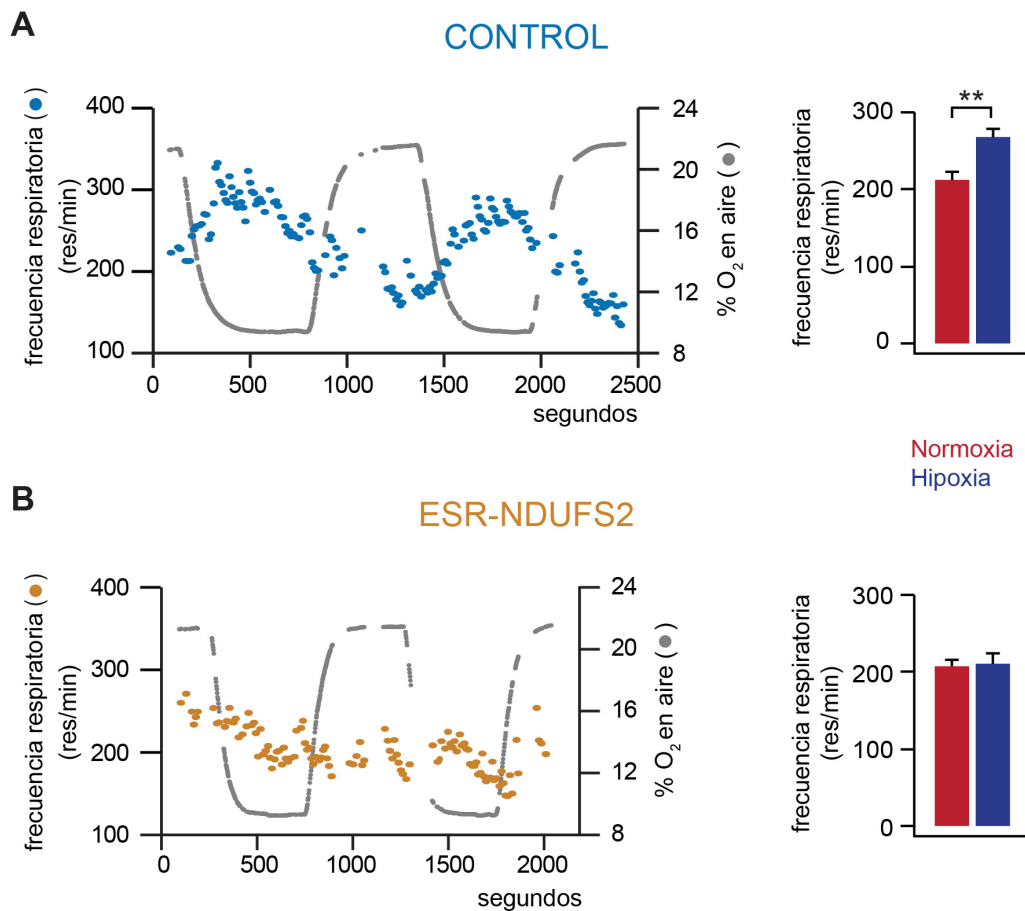


Figura 36. Respuesta hiperventilatoria en hipoxia de los ratones controles y ESR-NDUFS2.

(A) Registro de plestismografía representativo de ratones controles ilustrando los cambios de la frecuencia respiratoria durante los periodos de normoxia (~21% O₂) e hipoxia (~10% O₂) (n=10). (B) Registro de plestismografía representativo de ratones ESR-NDUFS2; nótese que la frecuencia respiratoria no varía entre los periodos de normoxia (~21% O₂) e hipoxia (~10% O₂) (n=10). ** p<0,01

3.5. Propiedades funcionales de las células glómicas de animales controles y ESR-NDUFS2

Las respuestas funcionales de las células glómicas de animales ESR-NDUFS2 se estudiaron mediante la monitorización de la actividad secretora en rodajas de CC o la medida de la [Ca²⁺] citosólico en células dispersas. En la figura 37A se muestran registros amperométricos representativos de células procedentes de animales controles y ESR-NDUFS2. Las respuestas secretoras a alto K⁺ e hipercapnia fueron similares en los dos tipos celulares, aunque las células deficientes de Ndufs2 mostraron una casi absoluta insensibilidad a la

hipoxia. El número de células glómicas que respondían a hipoglucemia o hipercapnia fue similar en animales controles y ESR-NDUFS2, pero en estos últimos se encontraron menos células sensibles a hipoxia y las que respondían lo hicieron con una tasa de secreción muy inferior a la normal (Figura 37B-C). Por el contrario, la tasa de secreción durante la exposición a alto potasio fue prácticamente normal en las células deficientes en Ndufs2 (Figure 37D).

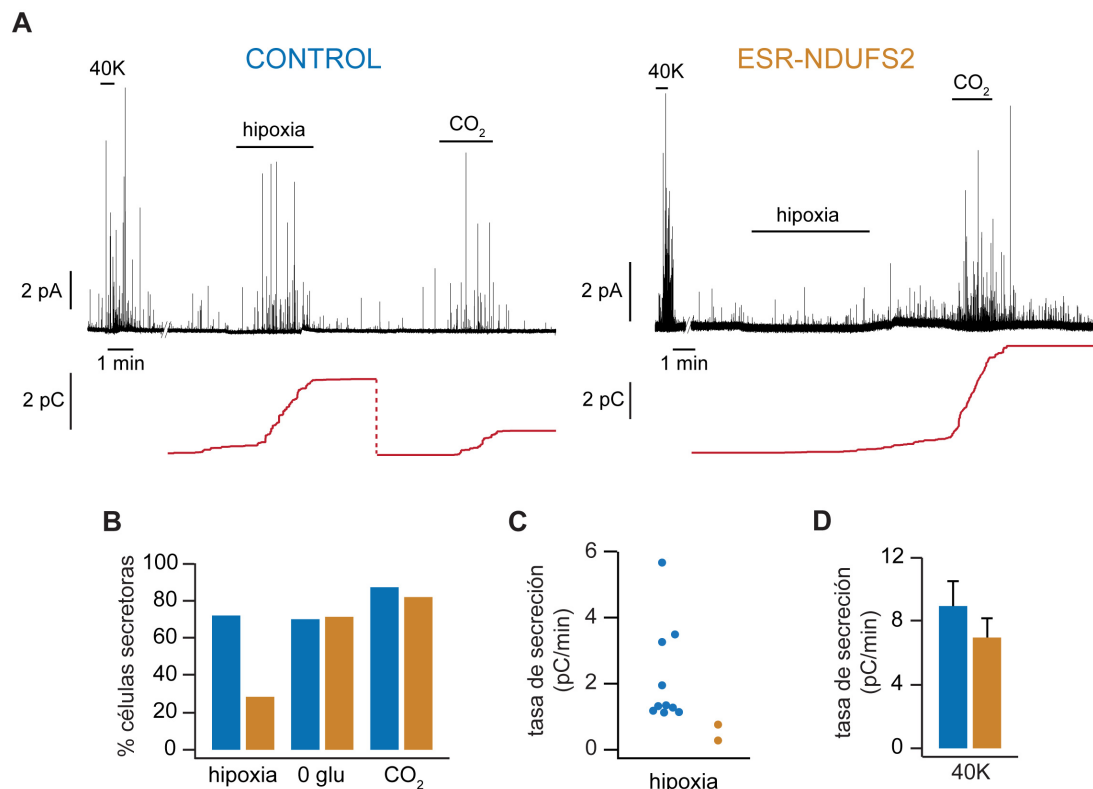


Figura 37. Respuesta secretora de las células glómicas de ratones controles y ESR-NDUFS2.

(A) Registros amperométricos representativos de células controles (azul) y ESR-NDUFS2 (marrón) mostrando la respuesta secretora a hipoxia e hipercapnia (CO₂). La secreción acumulada se muestra debajo de cada registro. (B) Porcentaje de células que responden a hipoxia, hipoglucemia (0 glu) e hipercapnia en controles (n=18, 10 y 8, respectivamente) y ESR-NDUFS2 (n=7, 7 y 11, respectivamente). (C) Tasa de secreción en respuesta a hipoxia de células controles (n=11) y ESR-NDUFS2 (n=2). (D) Tasa de secreción frente a 40 mM KCl (40K) de células controles (n=11) y ESR-NDUFS2 (n=7).

Las propiedades funcionales de las células glómicas del CC de los ratones ESR-NDUFS2 se analizaron también mediante la medida del incremento de la $[Ca^{2+}]_{in}$ frente a los diferentes estímulos. En las células

glómicas de los ratones ESR-NDUFS2 no se detectó el característico incremento de la $[Ca^{2+}]_{in}$ al exponerlas a hipoxia pero su capacidad de responder a alto K^+ , hipercapnia e hipoglucemia se mantuvo intacta (Figura 38). En su conjunto, los datos descritos en este apartado indican que las células glómicas de los ratones ESR-NDUFS2 son insensibles a los cambios de PO_2 , confirmando, por tanto, que la delección de la subunidad Ndufs2 abole de forma selectiva la respuesta a hipoxia.

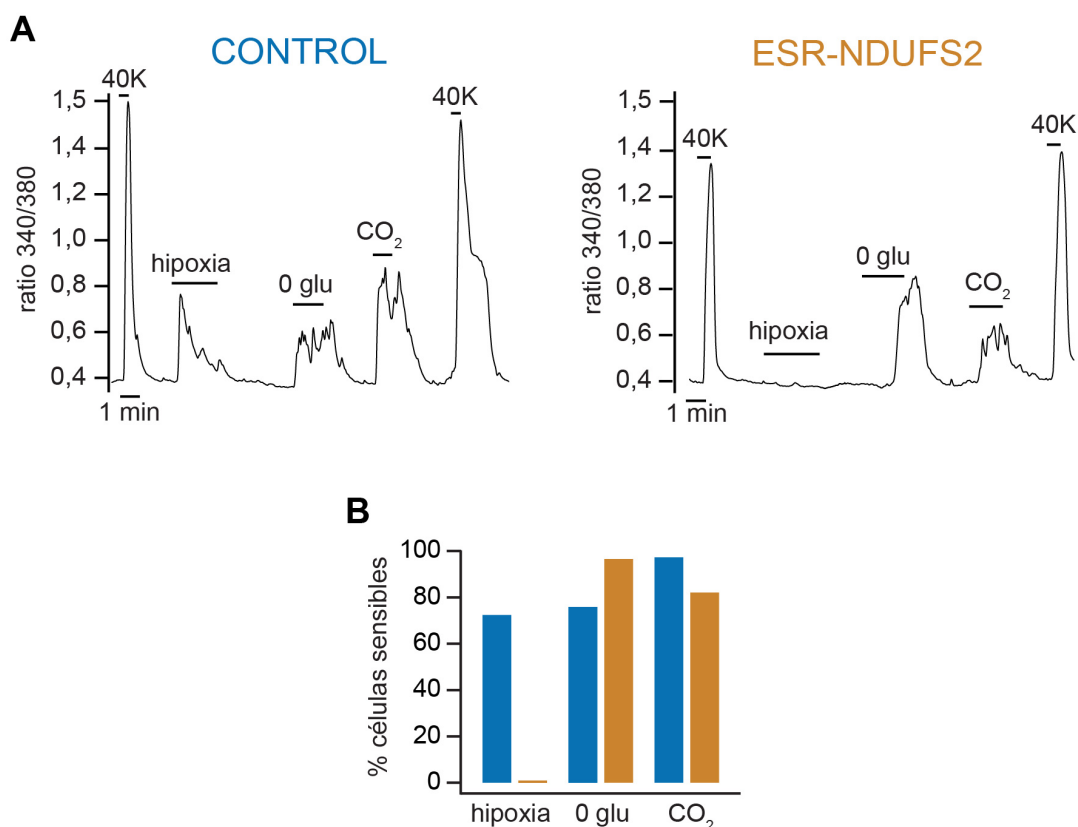


Figura 38. Aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular de las células glómicas de ratones controles y ESR-NDUFS2.

(A) Registros representativos de los cambios en la $[Ca^{2+}]_{in}$ intracelular en células glómicas controles y ESR-NDUFS2. (B) Porcentaje de células que responden a hipoxia, hipoglucemia (0 glu), hipercapnia (CO₂) en controles (n=64) y ESR-NDUFS2 (n=43).

4. Efecto de la delección de la subunidad Ndufs2 sobre la respuesta secretora a la hipoxia en las células cromafines

Con el objetivo de estudiar si la subunidad Ndufs2 del CMI también tiene una función esencial en la sensibilidad a hipoxia aguda de otros quimiorreceptores aparte del CC, se analizó la capacidad secretora de las

células cromafines de la MA en los modelos TH-NDUFS2 y ESR-NDUFS2. Para ello se empleó la técnica de amperometría y la preparación de rodajas de MA (Munoz-Cabello et al., 2005; Nurse et al., 2009). Las células cromafines procedentes de animales adultos (2-4 meses) mostraron una

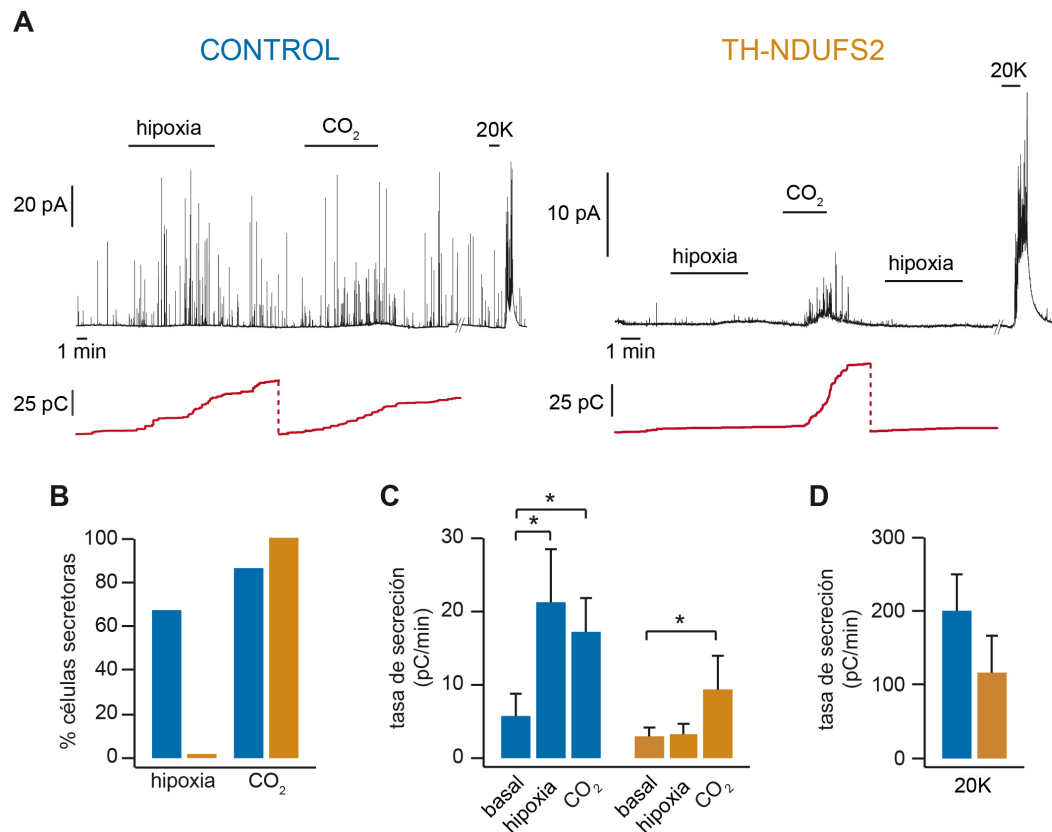


Figura 39. Respuesta secretora de las células cromafines de ratones controles y TH-NDUFS2.

(A) Registros amperométricos de células cromafines controles (azul) y TH-NDUFS2 (marrón) mostrando la respuesta secretora a hipoxia, hipercapnia (CO₂) y 20 mM KCl. (20K). La secreción acumulada se muestra bajo de cada registro. (B) Porcentaje de células con respuesta a hipoxia e hipercapnia en controles (n= 8) y TH-NDUFS2 (n=5). (C) Tasa de secreción medida en condiciones basales, hipoxia e hipercapnia en células controles (n=8, 6 y 6, respectivamente) y TH-NDUFS2 (n=5). (D) Tasa de secreción frente a 20K de células controles (n=8) y ESR-NDUFS2 (n=5). * p<0,05.

secreción basal elevada pero, a pesar de ello, se pudo observar un incremento claro en la actividad secretora durante la exposición a hipoxia y a hipercapnia. En MAs procedentes de animales TH-NDUFS2 no se observaron respuestas a hipoxia en ninguna de las células estudiadas aunque éstas mostraron una sensibilidad prácticamente normal a hipercapnia y alto potasio (Figura 39). El

análisis de la MAS de animales ESR-NDUFS2 produjo los mismos resultados (Figura 40). Por lo tanto, la subunidad Ndufs2 no sólo es fundamental para la respuesta a hipoxia en las células glómicas del CC, sino también en las células cromafines de la MA.

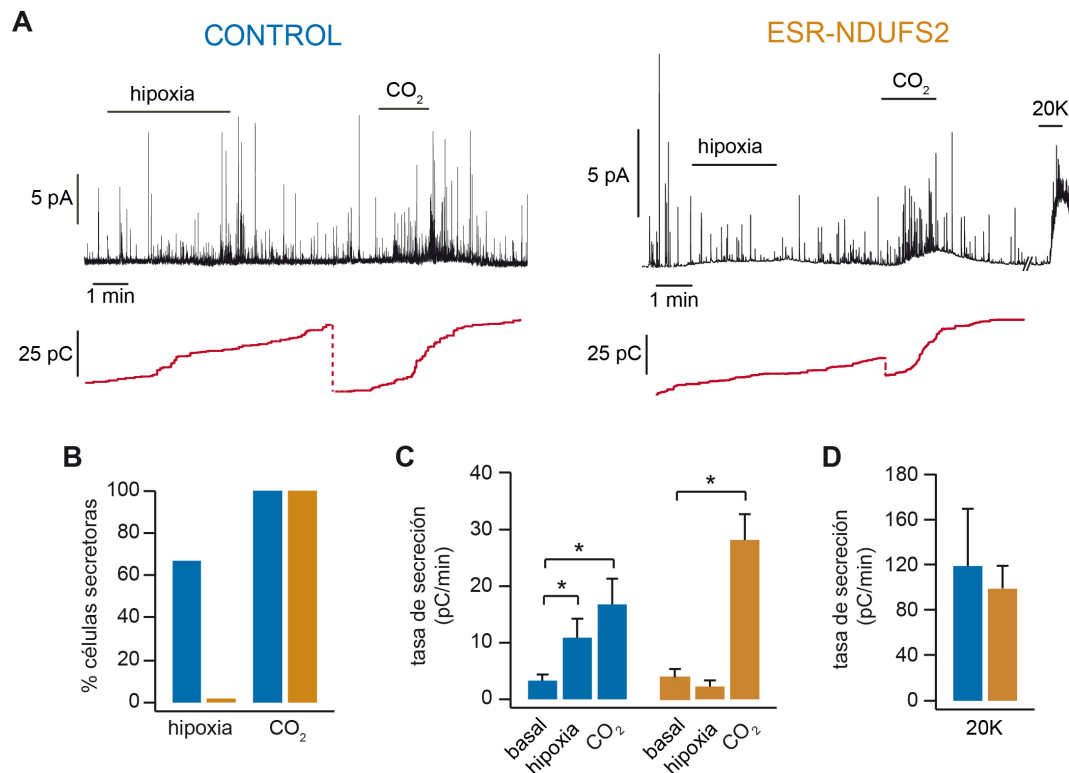


Figura 40. Respuesta secretora de las células cromafines de ratones controles y ESR-NDUFS2.

(A) Registros amperométricos representativos de células cromafines controles (azul) y TH-NDUFS2 (marrón) mostrando la respuesta secretora a hipoxia, hipercapnia (CO_2) y 20 mM KCl (20K). La secreción acumulada se muestra debajo de cada registro. (B) Porcentaje de células que responden a hipoxia e hipercapnia en controles y ESR-NDUFS2. (C) Tasa de secreción medida en condiciones basales, hipoxia e hipercapnia en células controles y ESR-NDUFS2. (D) Tasa de secreción frente a 20K de células controles y ESR-NDUFS2. Control (n=6); ESR-NDUFS2 (n=7). * $p < 0,05$.

5. Mecanismos reguladores de la respuesta a la hipoxia aguda

En apartados anteriores de esta tesis se ha mostrado que la delección de la subunidad Ndufs2 afecta severamente a la función del CMI y que ello conlleva la anulación de la respuesta a hipoxia de las células quimiosensoras del CC y de la MA. A continuación, se describen los resultados de los

experimentos realizados para estudiar en detalle los mecanismos implicados en la sensibilidad y señalización de la hipoxia.

5.1. Ensamblaje del complejo I mitocondrial

Para determinar el impacto de la ablación de la subunidad Ndufs2 sobre la estructura del CMI, se estudió el estado de dicho complejo en extractos mitocondriales de riñón de los ratones ESR-NDUFS2 mediante la técnica de *blue native*. En las muestras de ratones controles se observaron varias bandas características que corresponden a supercomplejos y a los diferentes complejos mitocondriales (Tello et al., 2011; Wittig et al., 2006)). En las muestras procedentes de los ratones ESR-NDUFS2 se observó la ausencia selectiva de la banda correspondiente al CMI (Figura 36A, izquierda). Para confirmar que la banda del CMI observada mediante *blue native* corresponde a proteínas del CMI, se realizaron *western blots* empleando anticuerpos frente a subunidades del CMI (Ndufs2, Ndufs1 y Ndufv2, mt-Nd1). En los extractos mitocondriales de ratones controles, los anticuerpos detectaron estructuras del tamaño del CMI y otras de tamaño superior que correspondían a supercomplejos constituidos por la asociación del CMI con otros complejos mitocondriales (Figura 41A, derecha). Por el contrario, en los extractos de ESR-NDUFS2, no se detectó ninguna banda de tamaño correspondiente al CMI. Sin embargo, sí se observó en estos ratones una banda de peso molecular similar al del CMIII. En cualquier caso, la cantidad de proteína correspondiente a subunidades del CMI fue significativamente menor en los extractos de ratones ESR-NDUFS2 que en los controles (Figura 41B). También se analizaron los complejos II, III y IV mitocondriales y, tanto en los controles como en los ESR-NDUFS2, se detectaron bandas correspondientes a dichos complejos en los geles de *blue native*. Además, en los ratones ESR-NDUFS2 se produjo un aumento significativo de Sdhb y Uqcrcs1, que son subunidades del complejo II y III, respectivamente (Figura 41B). Estos resultados indican que la subunidad Ndufs2 es fundamental para el ensamblaje del CMI así como que su ablación afecta a la expresión de subunidades del propio CMI y de otros complejos de la CTE. También sugieren la existencia de subcomplejos o fragmentos del CMI en los ratones deficientes en la subunidad Ndufs2 (Mimaki et al., 2012).

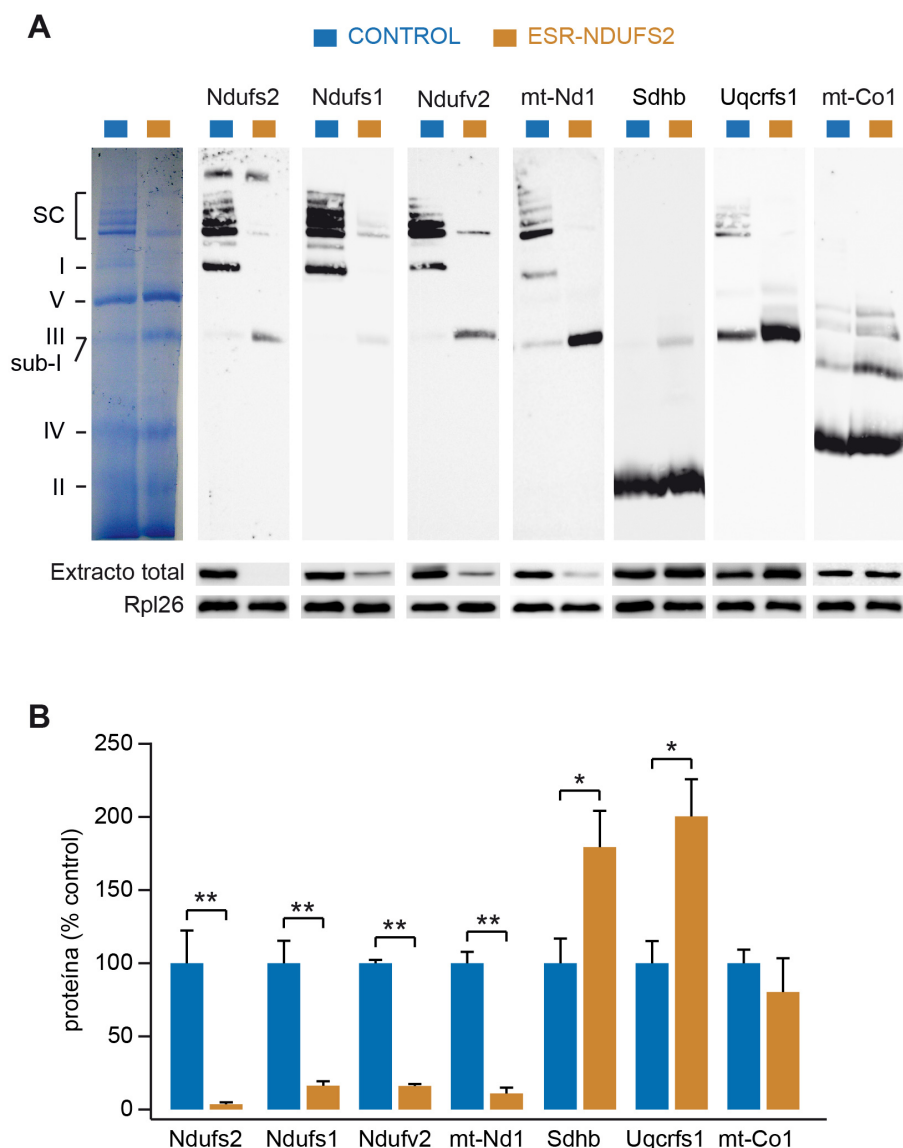


Figura 41. Análisis del ensamblaje de los complejos mitocondriales.

(A, izquierda) Gel *blue native* mostrando la ausencia de ensamblaje del complejo mitocondrial I (CMI) en las células de riñón de los ratones ESR-NDUFS2. (A, derecha) *Western blot* sobre gel *blue native* detectando subunidades de los complejos mitocondriales I (Ndufs2, Ndufs1, Ndufv2 y mt-Nd1), II (Sdhb), III (Uqcrcfs1) y IV (mt-Co1). (A, inferior) *Western blot* de extractos celulares de riñón de ratones controles y ESR-NDUFS2. (B) Niveles relativos de proteínas de los complejos I, II, III y IV. (n=3-4/grupo). *p<0,05, **p<0,01.

5.2. Contenido de succinato del cuerpo carotídeo

Una de las observaciones más sorprendentes e inesperadas de este trabajo es el mantenimiento de la estructura y niveles de ATP en el CC de animales deficientes de Ndufs2. Estas observaciones contrastan con datos previos de nuestro grupo demostrando que las células glómicas se destruyen

con gran facilidad en animales con disfunción de la subunidad Sdhb de la succinato deshidrogenasa (Díaz-Castro et al., 2012). Por tanto, los datos sugieren que las células glómicas poseen un metabolismo oxidativo basado en la ruta CMII-CMIV que mantiene la CTE y la producción de ATP, resistiendo de este modo la disfunción del CMI. Para evaluar esta hipótesis se midieron los niveles de succinato en CC de rata, que al ser de mayor tamaño que los de ratón proporcionan más cantidad de tejido. La figura 42 muestra que la concentración de succinato en el CC es varias veces superior a la medida en la MA e incluso en el cerebro, órgano con un metabolismo oxidativo muy abundante.

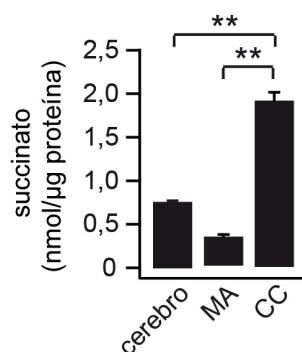


Figura 42. Contenido de succinato del cuerpo carotídeo, cerebro y médula adrenal de ratas.

CC: cuerpo carotídeo; MA: médula adrenal. n=3-4/tejido. *p<0,05, **p<0,01.

5.3. Respuesta a hipoxia de células glómicas TH-NDUFS2 incubadas con succinato

Dado que las células glómicas parecen mantener gran parte del metabolismo oxidativo basado en la succinato deshidrogenasa, investigamos si la anulación de la respuesta a hipoxia en los ratones carentes de *Ndufs2* se debía a un déficit general en la eficiencia de la CTE o era una consecuencia específica de la falta de CMI. Para ello, se incubaron células dispersas del CC de ratones TH-NDUFS2 con 4 mM succinato (de ellos, 2 mM metil-succinato que atraviesa con facilidad la membrana plasmática), con el objetivo de que tuviesen sustrato suficiente para que la CTE funcionase sin restricciones a través del CMII. Tanto las células controles como las deficientes de *Ndufs2*

cargadas con Fura-2 mostraron los típicos incrementos de la $[Ca^{2+}]_{in}$ en respuesta a alto K^+ o hipercapnia. No obstante, la respuesta a hipoxia, que se mantuvo en valores estándar en las células glómicas normales, desapareció por completo en las deficientes de Ndufs2 (Figura. 38A). En estas condiciones experimentales, el análisis cuantitativo

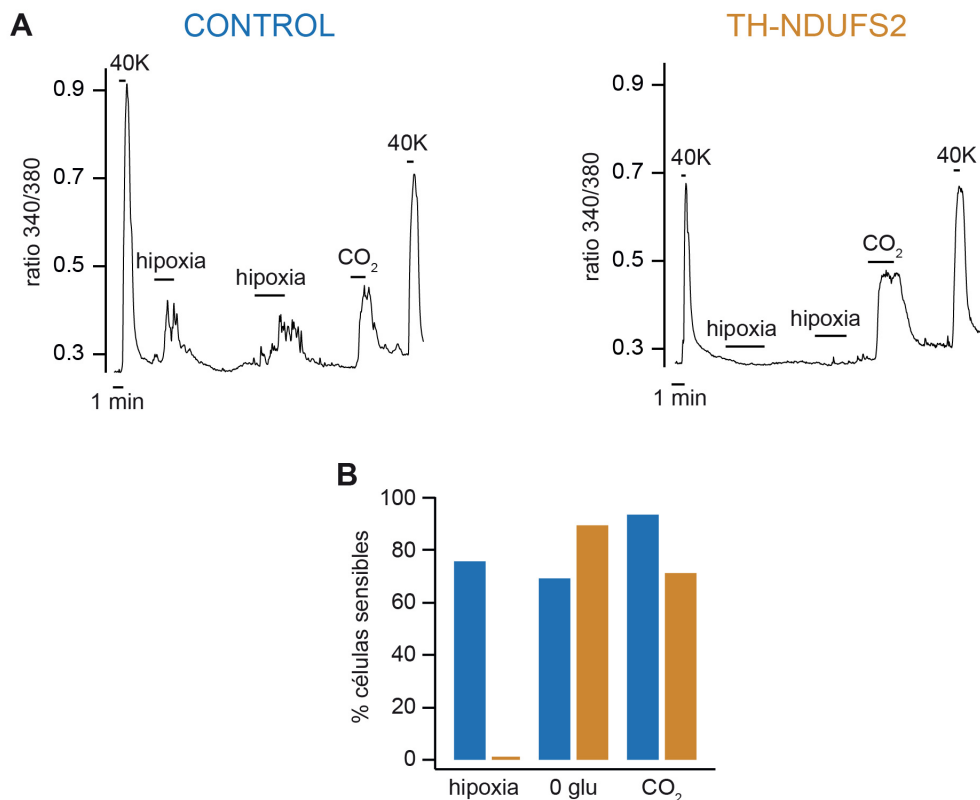


Figura 43. Caracterización de la respuesta a hipoxia en células glómicas tratadas con succinato.

(A) Registros de los cambios en la concentración de $[Ca^{2+}]$ intracelular inducidos por hipoxia, hipercapnia y alto K^+ en células glómicas controles (azul) y TH-NDUFS2 (marrón) incubadas con 4 mM succinato. (B) Porcentaje de células controles (n=74) y TH-NDUFS2 (n=84), incubadas con succinato, que responden a hipoxia, hipoglucemia (0 glu) e hipercapnia (CO₂).

comparando la sensibilidad a hipoxia, hipoglucemia e hipercapnia, fue similar al mostrado previamente en las células de ratón TH-NDUFS2 (compárese las figuras 24B y 43B). Estos resultados sugieren que, aunque la CTE funcione correctamente por la vía CMII-CMIV, el CMI es necesario para que las células respondan a hipoxia.

5.4. Efecto de agentes redox en la respuesta a hipoxia de las células glómicas

Las características electrofisiológicas de las células glómicas de ratones controles y TH-NDUFS2 se han descrito en apartados anteriores (ver “apartado 2.5.3”). En condiciones de normoxia, las células glómicas mutantes muestran un incremento de la resistencia de entrada, debido a la inhibición de los canales *leakage* de K^+ , menor corriente de K^+ voltaje-dependiente y un potencial de reposo menos negativo que las células controles. Este fenotipo electrofisiológico de las células TH-NDUFS2 se asemeja al de las células controles sometidas a hipoxia. En la mayoría de los casos estudiados, las mutaciones en los complejos mitocondriales produce incremento en la producción de ROS debido al escape de electrones en intermediarios reducidos de la CTE (Diaz-Castro et al., 2012). Por tanto, nos planteamos la posibilidad de que en KO de la subunidad Ndufs2 se produjesen subcomplejos del CMI (ver “apartado 5.3”) con actividad NADH oxidorreductasa residual que al carecer del sitio de unión a ubiquinona generarían radical O_2^- que a su vez podría pasar al citoplasma y oxidar residuos amino acídicos intracelulares en los canales de K^+ . Para determinar si el fenotipo electrofisiológico de las células glómicas mutantes se debía a un incremento de la actividad oxidante intracelular celular se realizaron experimentos de *patch-clamp* (parche perforado) dializando las células glómicas con agentes reductores. La figura 44A muestra que la aplicación de N-acetilcisteína a bajas concentraciones (NAC; 25-50 μ M) al interior de células deficientes de Ndufs2 produce una disminución de la resistencia de entrada (aumenta en al amplitud de la corriente *leakage*) hasta alcanzar valores similares a los de las células controles. Sin embargo, a pesar de revertir el fenotipo electrofisiológico, las células glómicas TH-NDUFS2 dializarlas con NAC permanecieron insensibles a hipoxia (Figura 44B).

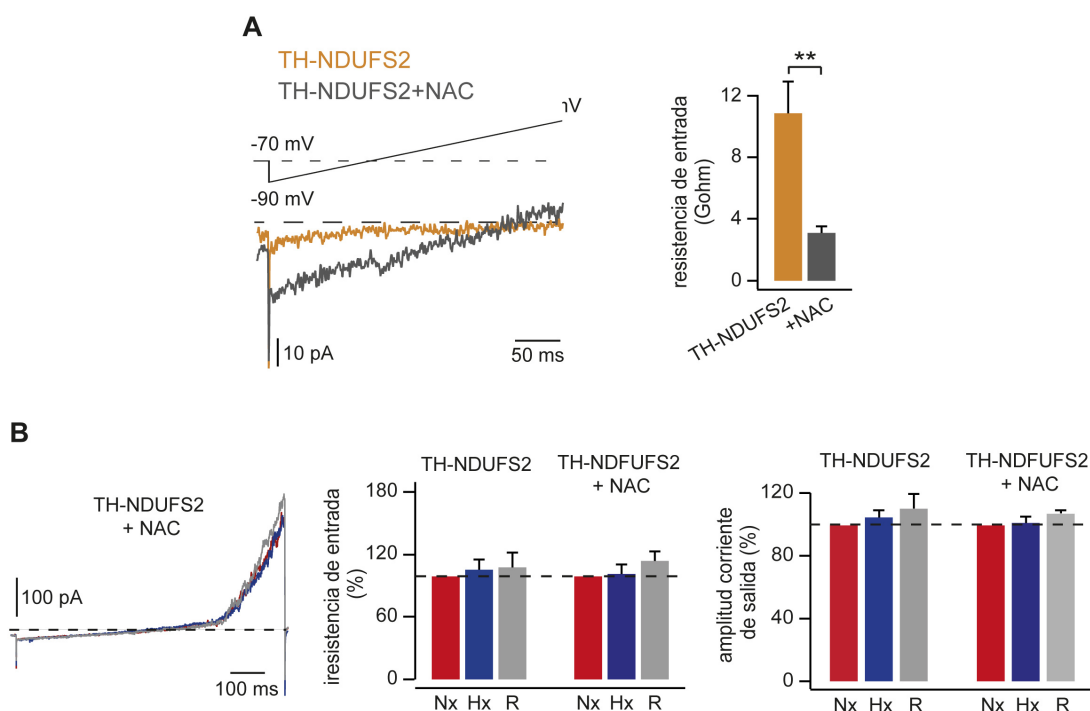


Figura 44. Efecto de la N-acetilcisteína sobre las células glómicas TH-NDUFS2.

(A, izquierda) Protocolo de rampa despolarizante y registros de células glómicas TH-NDUFS2 sin tratar (amarillo) y dializadas con N-acetilcisteína (NAC) (gris, 25 μ M). (A, derecha) Cuantificación de la resistencia de entrada de las células TH-NDUFS2 (n=8). (B, izquierda) Registro representativo de células TH-NDUFS2 dializadas con NAC en condiciones de normoxia (rojo), hipoxia (azul) y recuperación (gris). (B, derecha) Cambios en la resistencia de entrada y la amplitud de la corriente de células TH-NDUFS2 (n=5) dializadas con NAC en condiciones de normoxia, hipoxia y recuperación. **p<0,01

En paralelo a los experimentos descritos en el párrafo anterior, se estudió el efecto de la diálisis intracelular con agentes redox sobre la modulación por hipoxia de las corrientes de K^+ en células glómicas controles. La aplicación de H_2O_2 (15-50 μ M) en la pipeta de registro provocó un aumento en la resistencia de entrada similar al producido por la exposición a hipoxia (Figura 45A); lo cual además, anuló la regulación de la corriente *leakage* de K^+ en hipoxia (Figura 45B). Por otro lado, la diálisis de las células controles con NAC no tuvo ningún efecto sobre la resistencia de entrada (Figura 45B). A las concentraciones utilizadas (<50 μ M), los agentes redox (NAC y H_2O_2) no afectaron a la regulación por hipoxia de la corriente de K^+ voltaje-dependiente. Aunque se intentó estudiar el efecto de concentraciones

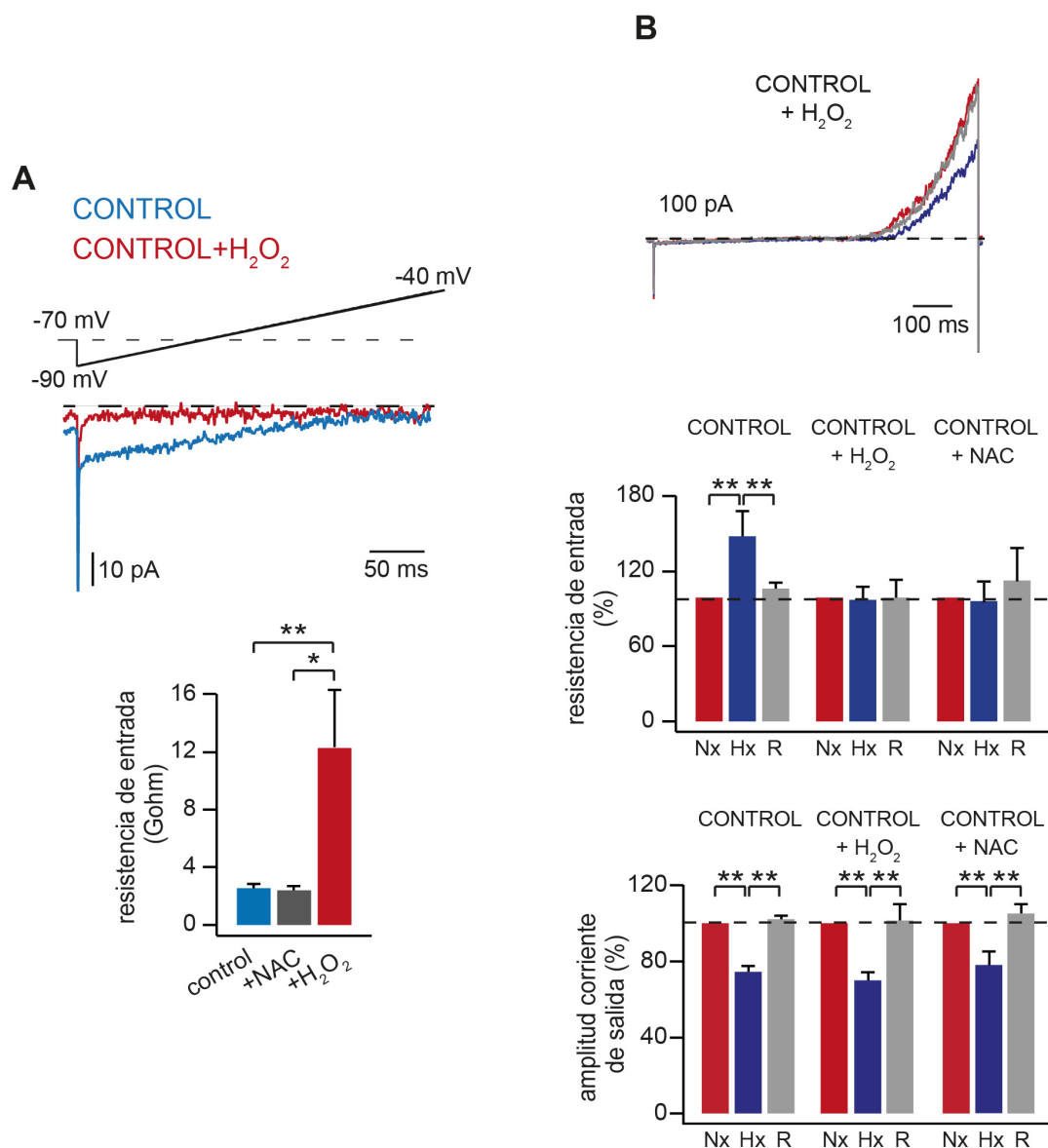


Figura 45. Efecto del H₂O₂ sobre las células glómicas controles.

(A, superior) Protocolo de rampa despolarizante y registros de células glómicas controles sin tratar (azul) y dializadas con H₂O₂ (rojo, 15 μ M). (A, debajo) Cuantificación de la resistencia de entrada de las células controles sin tratar y dializadas con NAC (25 μ M, n=10) o H₂O₂ (15-50 μ M, n=11). (B, superior) Registro representativo de células controles dializadas con H₂O₂ en condiciones de normoxia (rojo), hipoxia (azul) y recuperación (gris). (B, inferior) Cuantificación de la resistencia de entrada y la amplitud de la corriente de células controles (n=8) dializadas con H₂O₂ (15 μ M, n=8) y NAC (25-50 μ M, n=7) en condiciones de normoxia, hipoxia y recuperación. *p<0,05, **p<0,01

superiores, los experimentos no dieron resultados concluyentes debido a inestabilidad de los registros. Los resultados obtenidos mediante la diálisis de las células con agentes redox sugieren que las ROS son responsables de la

regulación de la corriente de K^+ (al menos el componente mediado por canales *leakage*) en hipoxia. Para estudiar de forma directa si la hipoxia produce un cambio en la producción de ROS en las células glómicas se utilizó un sensor fluorescente (GPD-roGFP) (Waypa et al., 2010) con expresión dirigida al espacio intermembrana mitocondrial (Figura 46A-B). En células controles, la hipoxia produjo incremento reversible de agentes oxidantes que no se observaron en las preparaciones de animales TH-NDUFS2 (Figura 46C).

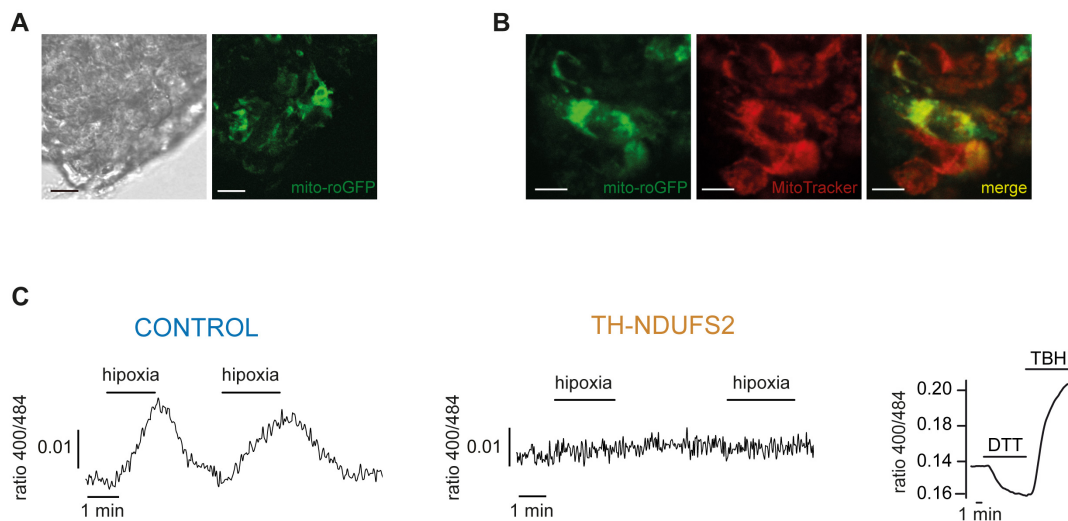


Figura 46. Señalización de la hipoxia mediante especies reactivas de oxígeno.

(A) Imagen de campo claro (A, izquierda) de rodajas de cuerpo carotídeo transfectadas con el sensor redox GPD-roGFP (A, derecha). (B) Imagen de una célula glómica mostrando la expresión de GPD-roGFP (B, izquierda) en las mitocondrias, identificadas con MitoTracker (B, centro); colocalización de GPD-roGFP y MitoTracker (B, derecha). (C, izquierda) Registros de los cambios en las especies reactivas de oxígeno de células glómicas controles y TH-NDUFS2. (C, derecha) Calibración con el agente reductor DTT (1 mM, ditiotreitól) y el oxidante TBH (1 mM, *ter*-butilhidroperóxido). Barras de calibración: 25 μ m (A); 10 μ m (B).

5.5. Efecto del NADH en la regulación por hipoxia de la corriente de K^+ voltaje-dependiente

Los experimentos del apartado anterior sugieren que la hipoxia produce una inhibición del CMI lo que conlleva la acumulación de ROS. Otro sustrato de la actividad del CMI es el NADH, cuya concentración se sabe incrementa en las células glómicas durante la exposición a baja PO_2 (Buckler and Turner, 2013; Duchén and Biscoe, 1992a). En nuestras condiciones experimentales la

hipoxia produjo en células controles un incremento reversible de la autofluorescencia debida a la acumulación de los nucleótidos

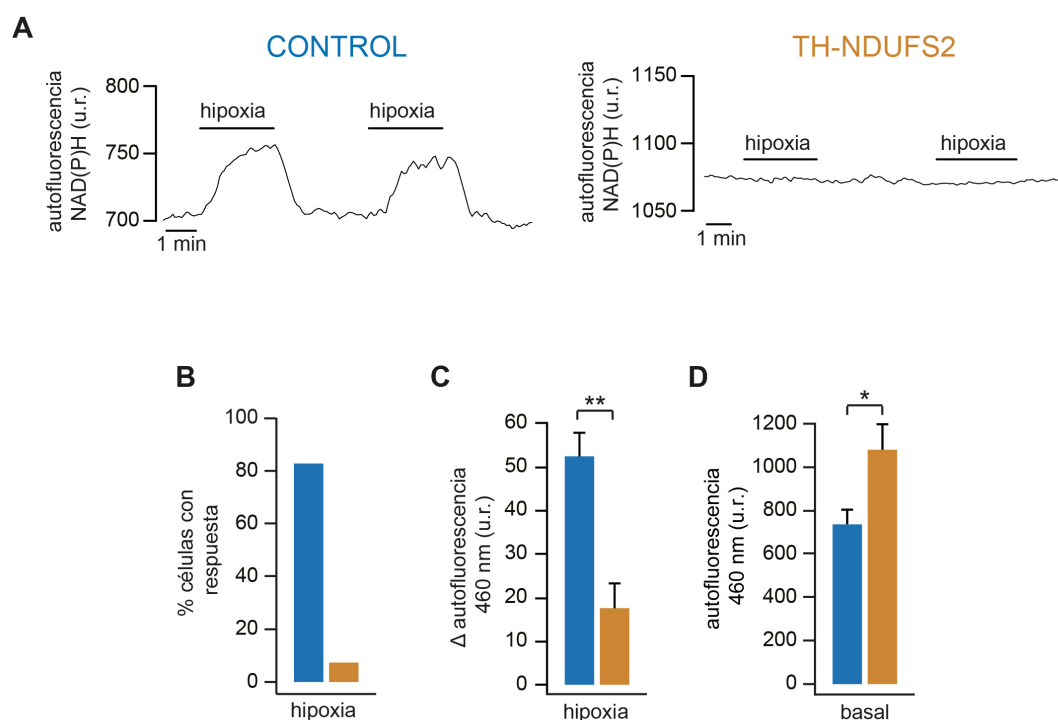


Figura 47. Efecto de la hipoxia en los niveles de NADH de las células glómicas de ratones controles y TH-NDUFS2.

(A) Registros representativos de los cambios en la autofluorescencia de NAD(P)H al exponer las células glómicas controles (azul) y TH-NDUFS2 (marrón) a hipoxia.

(B) Porcentaje de células controles (n=83) y TH-NDUFS2 (n=69) en las que se registró un incremento de autofluorescencia NAD(P)H en hipoxia. (C) Incremento de autofluorescencia NAD(P)H en células controles (n=57) y TH-NDUFS2 (n=6) sometidas a hipoxia. (D) Nivel basal de autofluorescencia de NAD(P)H en células controles (n=25) y TH-NDUFS2 (n=17). u.r.: unidades relativas. *p<0,05, *p<0,01.

de piridina (NADH y NADPH) que no se observó en la mayoría de las células deficientes de Ndufs2 (Figura 47A-B). En aquellas células TH-NDUFS2 en las que se detectó un incremento de NADH en hipoxia, éste fue muy inferior al registrado en las células controles (Figura 47C). Las células TH-NDUFS2 mostraron un nivel elevado de autofluorescencia basal (Figura 47D), lo que podría ser debido a la acumulación de NADH como consecuencia de la inhibición de la actividad NADH/ubiquinona oxidoreductasa en estas células. Si la hipoxia produce acumulación de NADH, existe la posibilidad de que este

agente, tras transportarse al citoplasma por la lanzadera malato/aspartato, contribuya a la modulación por hipoxia de las corrientes de K^+ , especialmente las voltaje-dependientes. De hecho, existe una abundante literatura sobre la regulación de diferentes tipos de canales de K^+ por formas oxidadas y reducidas de nucleótidos de piridina (Kilfoil et al., 2013). El alto peso molecular (>660 Da) del NADH evita su uso en experimentos de parche perforado necesarios para obtener registros estables de la modulación de los canales iónicos por la hipoxia. No obstante, experimentos llevados a cabo en células registradas en la configuración de *whole-cell*, indican que la diálisis intracelular con NADH reduce en gran medida la modulación de la corriente

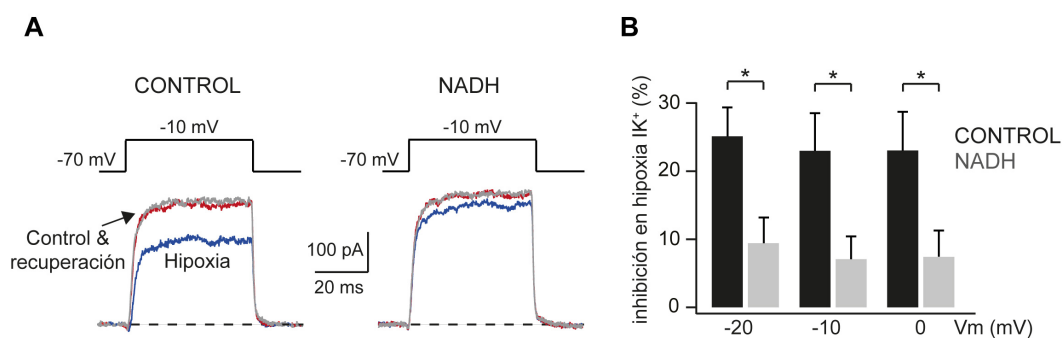


Figura 48. Efecto del NADH sobre la corriente voltaje-dependiente.

(A) Registros de corrientes de K^+ voltaje-dependientes en células controles sin dializar (CONTROL) y dializadas (NADH) con NADH (150 μ M) en condiciones de normoxia (rojo), hipoxia (azul) y recuperación (gris). (B) Cuantificación del efecto del NADH sobre la regulación de la corriente de K^+ voltaje-dependiente a distintos valores de despolarización de la membrana plasmática. Control (n=11); NADH (n=8) (B). * $p < 0,05$.

de K^+ voltaje-dependiente por la hipoxia (Figura 48). Los datos experimentales sugieren que en células glómicas la hipoxia provoca un incremento en la producción de ROS y NADH originados en el CMI. La acumulación de substratos/productos del MCI inhibe los canales de K^+ y conlleva a la despolarización celular (ver “Discusión”).

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

La sensibilidad a hipoxia aguda es una propiedad fundamental de los quimiorreceptores arteriales, que permite a los organismos mantener la homeostasis del medio interno en condiciones de escasez de O_2 . La capacidad de detectar los cambios en la PO_2 del ambiente y de responder a ellos rápidamente modulando la función respiratoria y cardiovascular, permite a los organismos adaptarse a distintas situaciones y hábitats. El mecanismo de quimiotransducción de la hipoxia ha sido ampliamente estudiado en preparaciones de CC, el principal quimiorreceptor periférico, y actualmente existe un amplio consenso en torno al modelo de quimiotransducción basado en canales de K^+ sensibles a O_2 (ver “Introducción”). No obstante, la naturaleza de la molécula (o moléculas) “sensora de O_2 ” aún se desconoce. En el campo de la sensibilidad a la hipoxia aguda coexisten varias hipótesis sobre el “sensor de O_2 ” pero ninguna de ellas ha podido ser demostrada de forma inequívoca (Lopez-Barneo, 2003; Prabhakar and Peers, 2014).

Una serie de experimentos realizados en nuestro grupo mostraron que el bloqueo del CMI en el sitio de unión de ubiquinona elimina la respuesta a hipoxia de las células glómicas del CC (Ortega-Saenz et al., 2003). Con el objetivo de investigar la función del CMI en el mecanismo de sensibilidad a hipoxia aguda, hemos generado y caracterizado dos modelos KO de la subunidad *Ndufs2*, una proteína que es parte fundamental del sitio de unión a ubiquinona del CMI. A continuación, se discuten los resultados obtenidos y, basándonos en ellos, proponemos un modelo de señalización de la hipoxia aguda en los quimiorreceptores arteriales.

1. Pérdida selectiva de la respuesta a hipoxia en las células glómicas

En esta tesis doctoral se ha descrito la generación y caracterización de dos modelos KO condicionales de la subunidad *Ndufs2*: el modelo TH-NDUFS2, embrionario y específico de tejidos catecolaminérgicos, y el modelo ESR-NDUFS2, inducible y ubicuo. Ambos son condicionales porque la delección de *Ndufs2* de forma embrionaria y ubicua es letal. Los animales TH-NDUFS2 mueren a los 2 meses de edad y los ESR-NDUFS2 a las 4 semanas desde la delección del gen *Ndufs2*, pero en ninguno de los casos se ha estudiado formalmente las causas de la muerte, ya que nuestro objetivo principal

consistió en estudiar los mecanismos de la sensibilidad a hipoxia aguda de los quimiorreceptores periféricos. No obstante, resultados preliminares muestran que los ratones TH-NDUFS2 sufren degeneración de estructuras catecolaminérgicas centrales, lo cual podría estar relacionado con su muerte prematura. Por otro lado, el síntoma más evidente del modelo ESR-NDUFS2 es una grave constipación intestinal, aunque desconocemos si ello es la causa de su muerte.

El impacto de la delección de *Ndufs2* sobre la respuesta ventilatoria a la hipoxia (RVH), una respuesta del organismo para aumentar la frecuencia respiratoria y compensar la escasez de O_2 , se evidenció, en primer lugar, en los ensayos de pletismografía, que mostraron que los ratones TH-NDUFS2 y ESR-NDUFS2 no hiperventilan cuando se exponen a una baja PO_2 . Los ratones KO de ambos modelos no presentan diferencias significativas con sus respectivos controles en condiciones de normoxia, lo cual indica que la delección de *Ndufs2* no afecta directamente a la función respiratoria basal. Por el contrario, sus parámetros respiratorios permanecen invariables en hipoxia, manteniendo la misma frecuencia respiratoria que en normoxia. Previamente, se han empleado modelos de ratón genéticamente modificados para probar hipótesis respecto al sensor de O_2 . En algunos de ellos se ha descrito una afectación de la RVH (Adachi et al., 2004), sin embargo, la sensibilidad a hipoxia de los quimiorreceptores periféricos de estos modelos, o de reproducciones farmacológicas de los mismos, permanece inalterada (Ortega-Saenz et al., 2006) (Ortega-Sáenz et al., datos no publicados). En cambio, la ausencia de RVH en los modelos TH-NDUFS2 y ESR-NDUFS2 se debe a que tanto el CC como la MA son insensibles a hipoxia. Este fenotipo reproduce los resultados obtenidos mediante la inhibición farmacológica del sitio de unión a ubiquinona del CMI en el CC (García-Fernández et al., 2007; Ortega-Saenz et al., 2003) y en la MA (Thompson et al., 2007). Por lo tanto, los modelos KO de la subunidad *Ndufs2* indican que la respuesta a hipoxia en los quimiorreceptores periféricos depende del CMI. Los datos de este trabajo también sugieren la existencia de un mecanismo único para la sensibilidad a hipoxia de los quimiorreceptores simpatoadrenales. Si este mismo sistema es el responsable de la sensibilidad a hipoxia aguda en otros elementos del sistema homeostático sensor de O_2 (Weir et al., 2005) aún está por determinar.

La abolición de la sensibilidad a hipoxia del CC y la MA en los modelos TH-NDUFS2 y ESR-NDUFS2 es selectiva ya que las respuestas a otros estímulos, como la hipoglucemia o la hipercapnia, se mantiene prácticamente inalteradas. Este fenotipo reproduce también observaciones previas de nuestro grupo que mostraron que la inhibición farmacológica del sitio de unión a ubiquinona del CMI elimina la respuesta a hipoxia pero no a hipoglucemia (Garcia-Fernandez et al., 2007). Aunque aún existe cierto debate sobre la sensibilidad a hipoglucemia del CC (Prabhakar and Peers, 2014), diversos autores han mostrado que las células glómicas son sensibles a dicho estímulo (Fitzgerald et al., 2009; Pardal and Lopez-Barneo, 2002; Zhang et al., 2007). Los resultados de esta Tesis Doctoral no sólo confirman esta propiedad de las células glómicas sino que, además, confirman que la sensibilidad a hipoxia e hipoglucemia depende de mecanismos distintos. Además, los datos de amperometría sugieren que el mecanismo de sensibilidad a hipoglucemia puede estar relacionado de alguna manera con el metabolismo intermediario, ya que la respuesta secretora a hipoglucemia es significativamente mayor en las células TH-NDUFS2 que en las controles. El análisis de la capacidad secretora de las células glómicas de los modelos KO de Ndufs2 indica que mantienen un buen estado fisiológico, puesto que el porcentaje de estas células que responden a alto potasio, hipoglucemia e hipercapnia es similar al de las células controles. No obstante, y a diferencia de lo que ocurre con la hipoglucemia, se aprecia una tendencia a que la respuesta secretora frente a alto K^+ e hipercapnia sea menor en las células TH-NDUFS2 que en las controles. Esto podría deberse a que, aunque no significativamente, la densidad de canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes parece ser algo menor en las células TH-NDUFS2 que en las controles (ver más adelante). Las células glómicas TH-NDUFS2 están despolarizadas y, como ocurre en otras células glómicas procedentes de animales genéticamente modificados (Ortega-Saenz et al., 2010), ello decrece la expresión de canales de Ca^{2+} . El análisis de la entrada de Ca^{2+} extracelular, paso previo a la secreción de neurotransmisores (Buckler and Vaughan-Jones, 1994; Duchon et al., 1988), mostró idénticos resultados que los experimentos de amperometría, confirmando así que las células mutantes son selectivamente insensibles a hipoxia.

La pérdida selectiva de la respuesta a cambios de PO_2 tanto en el modelo TH-NDUFS2, embrionario, como en el ESR-NDUFS2, adulto, indica no sólo que el sitio de unión a ubiquinona es fundamental para la sensibilidad a hipoxia sino también que no existen mecanismos compensatorios que puedan sustituirlo, y sugiere que tan pronto se produce la disrupción de dicho sitio, se elimina la sensibilidad a hipoxia. De hecho, en un curso temporal realizado en el modelo ESR-NDUFS2 para estudiar mediante pletismografía la pérdida de la RVH, se observó que esta respuesta tarda en desaparecer por completo unas 6 semanas desde el inicio del tratamiento con TMX (datos no mostrados). Ello se debe probablemente al tiempo de recambio de la proteína Ndufs2 (Kim et al., 2012), sugiriendo que una vez se elimina por completo esta subunidad, desaparece también la sensibilidad a los cambios en la PO_2 .

La delección de la subunidad Ndufs2 afecta drásticamente a la función del CMI (Kashani-Poor et al., 2001). La proteína de 49kDa es una de las 14 subunidades conservadas del CMI y forma parte del bolsillo dónde se une la ubiquinona (ver “Introducción”) (Baradaran et al., 2013; Hirst, 2013). Por ello, en ausencia de Ndufs2, el CMI no se ensambla correctamente, tal y como muestran los resultados de *blue native*. En dichos experimentos se analizó el estado de los complejos mitocondriales en las células KO de Ndufs2. En los extractos mitocondriales de dichas células no se observa ninguna banda del tamaño del CMI, pero a la altura correspondiente al CMIII se observa una banda más intensa que en los controles. Esta banda corresponde, probablemente, a subcomplejos preensamblados del CMI ya que es reconocida por anticuerpos frente a subunidades del CMI. Esta posibilidad concuerda con el hecho de que aquellas proteínas mitocondriales que forman parte de una misma entidad o subcomplejo tienen una tasa de renovación muy parecida (Kim et al., 2012; Mimaki et al., 2012). Por ello, no es de extrañar que en las células mutantes de Ndufs2 existan subcomplejos del CMI que no pueden unirse debido a la ausencia de la proteína de 49kDa. Como consecuencia, en los ratones KO, la actividad del CMI disminuye aproximadamente un 80% y no se detecta consumo de O_2 dependiente de este complejo.

Debido a que la delección de Ndufs2 impide el ensamblaje del CMI, no podemos discriminar si la respuesta a hipoxia depende de la función del CMI al completo o, en concreto, del sitio de unión de ubiquinona. Para averiguarlo

hemos iniciado la comparación de nuestros modelos KO de Ndufs2 con el otro modelo de ratón KO del CMI descrito en la literatura hasta ahora (Kruse et al., 2008). En este modelo se deleta la subunidad Ndufs4 de manera ubicua y embrionaria. En contraste con los KO ubicuos y embrionarios de Ndufs2, que son letales, los ratones KO de Ndufs4 son viables hasta P50; probablemente porque esta proteína es una subunidad accesoria del CMI (Kmita and Zickermann, 2013) cuya delección no impide el ensamblaje de dicho complejo. No obstante, la eliminación de Ndufs4 sí afecta a su función, provocando que el consumo de O₂ dependiente del CMI descienda un 50% con respecto a los controles. Este descenso en la actividad catalítica del CMI a nivel sistémico produce encefalomiopatía (Kruse et al., 2008). En nuestro laboratorio hemos generado un modelo KO condicional de la subunidad Ndufs4 (gracias a los ratones “floxeados” Ndufs4 amablemente cedidos por el Dr. Albert Quintana), TH-NDUFS4, que es análogo al modelo TH-NDUFS2. Resultados preliminares han mostrado que la delección de Ndufs4 no elimina la sensibilidad a hipoxia, ya que en las rodajas de CC de los ratones TH-NDUFS4 se detecta una potente actividad secretora tanto a hipoxia como a otros estímulos. Ello indica que cuando el sitio de unión a ubiquinona está intacto, la sensibilidad a hipoxia permanece a pesar de la disfunción del CMI. Esta observación apoya la hipótesis de que la actividad oxidorreductasa de ubiquinona del CMI es fundamental para la señalización del estímulo hipóxico.

Puesto que la sensibilidad a hipoxia aguda depende de los quimiorreceptores periféricos, se analizó el estado del CC y de la MA en los dos modelos de ratón KO generados en este trabajo. En el modelo TH-NDUFS2 el CC está hipertrofiado mientras que la MA presenta una tendencia a ser más pequeña que en los controles, lo cual muestra que la disfunción del CMI afecta de forma distinta a ambos tejidos. En el modelo ESR-NDUFS2 no se ha observado un cambio significativo en el volumen del CC ni de la MA, posiblemente porque los ratones mueren antes de que se produzca un fenotipo estructural en estos tejidos. Respecto al CC del modelo TH-NDUFS2, es llamativo que la disfunción del CMI no sólo no produzca muerte celular, al menos en la ventana temporal analizada, sino que dé lugar a una proliferación de las células glómicas. El análisis de las estructuras subcelulares mediante microscopía electrónica mostró que las células glómicas de los ratones TH-

NDUFS2 poseen más mitocondrias y menos vesículas con neurotransmisores. Este último rasgo concuerda con los datos de amperometría, que muestran que la capacidad secretora de las células KO ante un estímulo neutro como el alto K^+ , es ligeramente menor. Por otro lado, el hecho de que la población mitocondrial sea mayor en las células glómicas de los ratones TH-NDUFS2 que en las de los animales controles, podría explicar que el nivel de ATP del CC de los ratones KO sea ligeramente superior al de los controles. En cambio, el nivel de ATP de la MA de los KO es significativamente inferior al de la MA de los controles. Contrariamente a lo que cabría esperar, estos datos muestran que el CC, que es uno de los tejidos con mayor consumo de O_2 (De Burgh Daly et al., 1954; Starlinger and Lubbers, 1976), es muy resistente a la disfunción del CMI. La elevada cantidad de succinato en el CC, que es significativamente superior a la de otros tejidos neurales como la MA o el cerebro, sugiere que la resistencia de las células glómicas a la disfunción del CMI se debe a que su metabolismo oxidativo depende principalmente del CMII. Sin embargo, a pesar de la relevancia del CMII en la CTE de las mitocondrias del CC, las células glómicas deficientes de Ndufs2 incubadas con succinato permanecieron insensibles a hipoxia. Este resultado, junto con la confirmación de que los mecanismos de sensibilidad a hipoxia e hipoglucemia son distintos, que los niveles de ATP se mantienen en el CC de los ratones KO de Ndufs2 y que, aún así, son insensibles a hipoxia, constituyen argumentos en contra de la hipótesis que propone que un descenso en los niveles de ATP sea el agente señalizador de la hipoxia (Williams et al., 2004).

En nuestro laboratorio se han generado varios modelos KO condicionales de la subunidad Sdhb del CMII, los cuales presentan disfunción de dicho complejo (Diaz-Castro et al., 2012; Piruat et al., 2004). En concreto, los modelos TH-SDHD y ESR-SDHD son análogos a los KO condicionales de la subunidad Ndufs2 del CMI. En los animales TH-SDHD se produce un descenso muy apreciable en el volumen del CC y de la MA, y en el modelo ESR-SDHD, que muere a las 3 semanas tras la administración de TMX, se observa una tendencia hacia la degeneración del CC (Diaz-Castro et al., 2012). Esta tesis doctoral ha aportado datos, como el elevado nivel de succinato del CC, que explican la alta vulnerabilidad de este tejido a la disfunción del CMII. El grave deterioro del CC y la MA de los modelos mutantes TH-SDHD y ESR-

SDHD impidieron el estudio de la sensibilidad a hipoxia en estos quimiorreceptores. No obstante, se han realizado experimentos de pletismografía en el modelo TH-SDHD (datos no publicados). La mayoría de estos ratones no toleraban la exposición a hipoxia, presentando un fenotipo similar al observado en un modelo de ratón con atrofia del CC y el sistema nervioso periférico simpático (Macias et al., 2014). Muchos de estos animales sufrían pérdida de consciencia al exponerlos a hipoxia, recuperándose momentos más tarde. Estas observaciones indican que los ratones TH-SDHD no puede adaptarse a este cambio ambiental debido a la atrofia del CC y la MA. En contraste, como ya se mencionó antes, los animales deficientes de *Ndufs2* no muestran ningún cambio en su frecuencia respiratoria, lo que sugiere que no detectan la disminución de la disminuir la PO_2 .

2. El complejo I mitocondrial modula la actividad de los canales de K^+ durante la hipoxia

El fenotipo electrofisiológico de las células KO de *Ndufs2* se caracteriza por la disminución en la amplitud de las corrientes de K^+ , *leakage* y voltaje-dependiente, que resulta en un potencial de membrana ligeramente despolarizado, lo que recuerda a las células controles expuestas a hipoxia. No obstante, otros parámetros como la corriente de Na^+ , que no se modula por hipoxia (Carpenter and Peers, 2001; Garcia-Fernandez et al., 2007), no cambian en las células KO. En conjunto, estos rasgos sugieren que la deficiencia del CMI produce un efecto de “hipoxia mantenida” e (Sahoo et al., 2014) en las células glómicas, que las mantendría activadas y explicaría la disminución del número de vesículas sinápticas y la proliferación del CC en los ratones TH-NDUFS2 mediante la “sinapsis quimioproliferativa” (Platero-Luengo et al., 2014), tal y como ocurre en los animales sometidos a hipoxia crónica (Arias-Stella and Valcarcel, 1976; McGregor et al., 1984; Pardal et al., 2007; Platero-Luengo et al., 2014).

La despolarización causada por la hipoxia se inicia con la inhibición de varios subtipos de canales *leakage* de K^+ (Buckler, 1997; Hescheler et al., 1989; Ortega-Saenz et al., 2010). Se ha descrito que en diferentes tipos celulares los canales de K^+ , tanto de la familia voltaje-dependiente (K_v) como de los “background o leakage” pueden modularse por ROS (Bychkov et al.,

1999; Papreck et al., 2012), pero existe un debate sobre si la producción de ROS disminuye o aumenta en hipoxia (Hamanaka and Chandel, 2010; Michelakis et al., 2004). Nuestros resultados muestran, por primera vez, que en el CC la hipoxia induce un incremento en la producción de ROS de origen mitocondrial (Hernansanz-Agustin et al., 2014; Waypa et al., 2013), y que éste depende fundamentalmente del CMI, puesto que no se observa en las células glómicas de los ratones KO de *Ndufs2*. Se ha demostrado también en este trabajo que las ROS son los agentes señalizadores de la hipoxia a los canales *leakage* de K^+ . Ello explica que las células carentes de *Ndufs2*, cuyo citoplasma presenta un elevado nivel de oxidación, tengan una alta resistencia de entrada. Este nivel de oxidación, probablemente causado por subcomplejos preensamblados del CMI (Mimaki et al., 2012) con actividad NADH oxidasa residual, se revierte al dializar las células con NAC, un agente reductor. A pesar de ello, las células deficientes de *Ndufs2* permanecen insensibles a hipoxia. Por otro lado, la diálisis de células glómicas controles con H_2O_2 , un agente oxidante, produce un fenotipo similar al registrado en la células KO: aumento de la resistencia de entrada y pérdida de la regulación de la corriente *leakage* de K^+ . Por otra parte, a pesar de que se ha descrito que algunos de los subtipos de canales K_v que existen en la células glómicas (Ganfornina and Lopez-Barneo, 1992; Lopez-Lopez et al., 2007; Peers, 1990b) son susceptibles de ser regulados por ROS (Sahoo et al., 2014), la aplicación de agentes reductores y oxidantes en la células controles no afectó a la regulación por hipoxia de la corriente de K^+ voltaje-dependiente. Es posible que las dosis de reductores y oxidantes ($<50 \mu M$) empleadas en nuestro trabajo no hayan sido suficientemente elevadas para producir un efecto sobre la corriente voltaje-dependiente. No obstante, esta circunstancia no pudo investigarse ya que cuando las células se dializaron con concentraciones superiores de dichos agentes los registros no eran estables. Hemos mostrado, no obstante, que la corriente de K^+ voltaje-dependientes se regula por nucleótidos de adenina. Este resultado era esperable teniendo en cuenta que se han descrito canales de K^+ que se regulan por nucleótidos de piridina (Timmers et al., 2003; Tipparaju et al., 2005) y que la hipoxia produce un aumento en la concentración citoplasmática de NADH (Buckler and Turner, 2013; Duchen and Biscoe, 1992a). El aumento de autofluorescencia de NADH en hipoxia se produjo en

las células glómicas controles pero no en las de ratones TH-NDUFS2. Sin embargo, en éstas últimas el nivel basal de autofluorescencia es mayor que en las controles, mostrando una acumulación de este nucleótido a causa de la disfunción del CMI. La diálisis de las células controles con NADH (registradas con la técnica de *whole-cell patch-clamp* ya que este compuesto tiene un peso molecular >600 D y no pasa por los poros de anfotericina) eliminó en buena medida la inhibición de la corriente de K^+ voltaje-dependiente en hipoxia, lo que sugiere que la disminución de la amplitud de la corriente de K^+ voltaje-dependiente de las células TH-NDUFS2 se debe a la inhibición parcial de estos canales por el elevado nivel de NADH presente en el citoplasma. Nuestros resultados indican la existencia de un mecanismo regulador de los canales de K^+ en hipoxia que es dependiente del CMI y está mediado por ROS y, posiblemente, por NADH.

3. Modelo de señalización de la hipoxia aguda en los quimiorreceptores arteriales

Los datos presentados en esta tesis doctoral evidencian que el CMI es fundamental para la respuesta a hipoxia aguda de los quimiorreceptores arteriales. Los resultados obtenidos sugieren un mecanismo para la señalización de la hipoxia basado en la producción de ROS y NADH por el CMI. Proponemos un modelo en el que el CMI puede adoptar dos estados dependiendo de la PO_2 . Dichos estados están caracterizados por baja producción de ROS y alta oxidación (bajos niveles) de NADH (normoxia) o alta producción de ROS y abundante reducción de NAD^+ (altos niveles de NADH) (hipoxia) (Figura 49). La regulación de la función del CMI aún no se conoce con detalle pero se ha descrito que este complejo mitocondrial puede adoptar dos conformaciones conocidas como activada y desactivada (Babot and Galkin, 2013). La conformación activada se produce cuando hay disponibilidad de sustratos (NADH y ubiquinona); en esta conformación transporta electrones desde el NADH hasta la ubiquinona. Cuando escasean los sustratos, el CMI adquiere espontáneamente la conformación desactivada. La conformación desactivada se revierte de forma lenta cuando vuelve a haber disponibilidad de sustratos (Babot and Galkin, 2013). Se ha propuesto que esta propiedad del CMI constituye una adaptación de la CTE a la escasez de O_2 cuya función

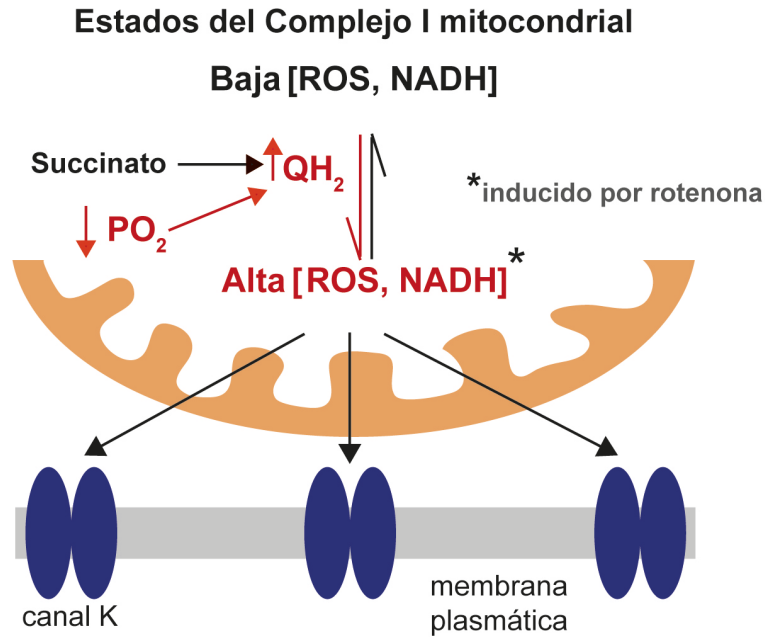


Figura 49. Modelo de sensibilidad a la hipoxia aguda en los quimiorreceptores arteriales.

QH₂: ubiquinona reducida

fisiológica sería proteger a la célula de la rápida producción de ROS que tiene lugar al producirse la reoxigenación (Babot et al., 2014). Aunque esta interesante propiedad del CMI podría explicar algunas de nuestras observaciones experimentales, nuestro modelo encaja mejor con la función catalítica reversible del CMI, una curiosa propiedad del CMI observada en estudios *in vitro* cuyo significado fisiológico se desconoce (Lambert and Brand, 2004; Liu et al., 2002; Votyakova and Reynolds, 2001). Como ocurre con la respuesta a hipoxia, la transición entre los estados directo y reverso del CMI es rápida y altamente reversible (Figura 50). Según el modelo que proponemos para la señalización de la hipoxia aguda, cuando desciende la PO₂, se acumula quinona reducida (QH₂) en la CTE y se induce el funcionamiento reverso del CMI. En modo reverso se produce NADH y ROS abundantemente; de hecho, se ha descrito que la tasa de producción de ROS en el modo reverso del CMI es la más alta que tiene lugar en la mitocondria (Murphy, 2009). Es posible que en las células glómicas, que tienen una alta tasa de reducción de ubiquinona dependiente del CMII y un consumo acelerado de O₂, la hipoxia disminuya la

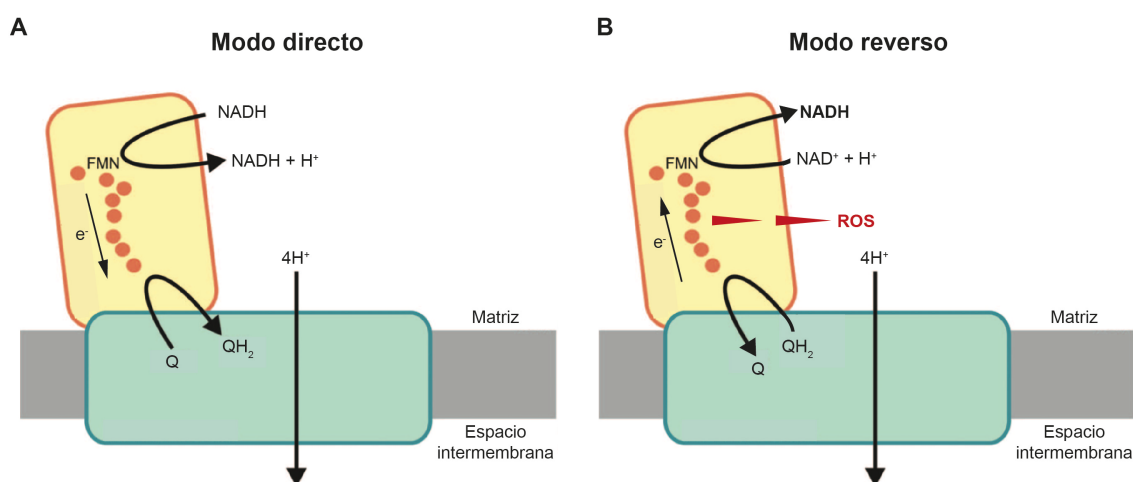


Figura 50. Funcionamiento directo y reverso del complejo I mitocondrial.

(A) Modo directo de la actividad del complejo I mitocondrial (CMI): flujo de electrones desde el NADH (oxidación) hasta la ubiquinona (Q; reducción). (B) Modo reverso de la actividad del CMI: flujo de electrones desde la ubiquinona reducida (QH₂; oxidación) hasta el NAD⁺ (reducción). Modificado de Hunte *et al.*, 2010.

tasa de oxidación de ubiquinona suficientemente como para acumular la cantidad de QH₂ necesaria para inducir el funcionamiento reverso del CMI. La rotenona bloquea tanto el funcionamiento directo como el reverso de esta enzima a la vez que favorece la producción de ROS debido al bloqueo de la transferencia de electrones a la ubiquinona (Lambert and Brand, 2004; Liu et al., 2002; Votyakova and Reynolds, 2001). Nuestro modelo (Figura 49), aunque con algunos elementos hipotéticos, explica la gran sensibilidad de las células glómicas a los inhibidores mitocondriales así como la eficacia con que la rotenona bloquea la respuesta a hipoxia. Además, es compatible con la existencia de otros mecanismos fisiológicos, o tratamientos farmacológicos, que modulen la actividad de los canales de K⁺ de la membrana y, por lo tanto, alteren la sensibilidad a hipoxia (Evans et al., 2005; Kemp and Peers, 2007; Lopez-Barneo et al., 2009; Nurse et al., 2006; Prabhakar and Peers, 2014). Las células glómicas son de pequeño tamaño y poseen una abundante cantidad de mitocondrias localizadas muy cerca de la membrana plasmática. Esta organización genera microdominios de comunicación entra la mitocondria y la membrana, cuya alta resistencia de entrada convierte pequeños cambios en la

corriente en una despolarización celular capaz de activar los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes.

En resumen, la vinculación de la función señalizadora del CMI con la sensibilidad aguda a la hipoxia constituye un avance crucial en el conocimiento del mecanismo molecular de la sensibilidad a la hipoxia aguda. Uno de los pocos procesos sensoriales que todavía permanecen sin una explicación molecular precisa. Nuestras observaciones podrían tener aplicabilidad en el tratamiento de patologías cardiorespiratorias como la apnea del sueño, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica o la hipertensión (Lopez-Barneo, 2003; Prabhakar and Peers, 2014). Por otra parte, la función reversa del CMI en hipoxia puede estar vinculada también con la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas causadas por la disfunción de este complejo como la enfermedad de Parkinson y de Alzheimer, la neuropatía óptica de Leber o el síndrome de Leigh, entre otras (Lin and Beal, 2006; Valsecchi et al., 2012).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Se han generado dos modelos de ratón *knockout* (KO) de la subunidad Ndufs2 del complejo I mitocondrial (CMI) con el objetivo de estudiar los mecanismos de transducción sensorial en las células quimiorreceptoras (células glómicas) del cuerpo carotídeo (CC). En el modelo TH-NDUFS2 la delección del gen *Ndufs2* es embrionaria y específica de tejidos catecolaminérgicos (CC, médula adrenal (MA) y ganglio cervical superior, entre otros). En el modelo ESR-NDUFS2 la delección del gen *Ndufs2* es ubicua y tiene lugar en la vida adulta (inducible por tamoxifeno).
2. Ninguno de los dos modelos estudiados muestran alteraciones ventilatorias aparentes en condiciones de normoxia (21% O₂). Sin embargo, la respuesta ventilatoria a la hipoxia (10% O₂), estudiada mediante pletismografía, se eliminó tanto en los animales TH-NDUFS2 como ESR-NDUFS2.
3. Las células glómicas deficientes de Ndufs2 muestran una densidad normal de canales iónicos voltaje-dependientes y respuestas secretoras a alto K⁺, hipercapnia e hipoglucemia normales. Sin embargo, son insensibles a la hipoxia. La pérdida selectiva de sensibilidad a la hipoxia de estas células se demostró también mediante medidas de Ca²⁺ intracelular y análisis de los canales de K⁺ regulados por O₂. La delección de Ndufs2 anula la sensibilidad a la hipoxia de forma selectiva pero no elimina la sensibilidad a otros estímulos, como la hipercapnia o la hipoglucemia, independientemente del momento de la vida del animal en el que se produzca.
4. En paralelo con los experimentos en el CC, se ha estudiado la sensibilidad a hipoxia de la MA en los modelos TH-NDUFS2 y ESR-NDUFS2. La delección de Ndufs2 afecta a las células cromafines del mismo modo que a las células glómicas, produciendo la pérdida selectiva de la sensibilidad a la hipoxia independientemente del momento de la vida del animal en el que se produzca.
5. La delección de Ndufs2 previene el ensamblaje del CMI y elimina, por lo tanto, su actividad NADH:ubiquinona oxidorreductasa y el consumo de O₂.

dependiente de este complejo mitocondrial, pero la CTE funciona correctamente a través de la vía CMII-CMIV. No obstante, a pesar de incubar las células deficientes de *Ndufs2* con succinato, sustrato del CMII, la insensibilidad a hipoxia permanece, evidenciando la función esencial del CMI en el mecanismo de sensibilidad a la hipoxia aguda.

6. Las células de los ratones KO de *Ndufs2* presentan un alto nivel de oxidación de su citoplasma, probablemente provocado por la actividad NADH oxidasa residual de subcomplejos preensamblados del CMI. La diálisis de las células KO con N-acetil-cisteína, un agente reductor, revierte su fenotipo electrofisiológico, disminuyendo su resistencia de entrada. Por otro lado, la diálisis de células controles con H_2O_2 , un agente oxidante, provoca un aumento de la resistencia de entrada. Además, el aumento de ROS de origen mitocondrial que se produce en las rodajas de CC de ratones controles sometidas a hipoxia no se observa en las células KO de *Ndufs2*. Estos resultados muestran que el CMI es fundamental para la producción de ROS en hipoxia que regulan los canales *leakage* de K^+ .

7. La hipoxia produce un aumento de los niveles de NAD(P)H citosólico en las células controles pero no tiene ningún efecto en las células KO de *Ndufs2*. No obstante, las células glómicas mutantes presentan una autofluorescencia de NAD(P)H mayor que las controles como consecuencia de la deficiencia del CMI. La diálisis de las células controles con NADH produce reduce la inhibición de los canales de K^+ voltaje-dependientes por la hipoxia. Estos resultados explican que las células glómicas carentes de *Ndufs2* tengan una menor amplitud de la corriente de K^+ voltaje-dependiente y sugieren que el NADH regula dicha corriente.

8. El fenotipo electrofisiológico de las células KO de *Ndufs2* (conclusiones 6 y 7), que recuerda al de las células controles sometidas a hipoxia, sugiere que la deficiencia del CMI causa un estado de “hipoxia mantenida”, que explicaría la hipertrofia del CC de los ratones KO.

9. El CC contiene mayor cantidad de succinato que otros tejidos neurales, como la MA y el cerebro, lo que indica que tiene un metabolismo altamente dependiente del CMII y justifica que el nivel de ATP de este tejido no disminuya en los animales KO de Ndufs2 con respecto a los controles. Esta adaptación metabólica explica que el CC sea más resistente a la disfunción del CMI que otros tejidos, como la MA, y además, es probable que facilite la gran sensibilidad a la hipoxia de las células glómicas.

10. Con los resultados de esta tesis doctoral hemos propuesto un modelo que, aunque con algunos elementos hipotéticos, explica el mecanismo molecular de sensibilidad a la hipoxia aguda de los quimiorreceptores arteriales. La hipoxia provoca la acumulación de ubiquinona reducida (QH₂) en el CMI, lo que induce la reversión de su actividad catalítica. Esta reversión aumenta en gran medida la tasa de producción de NADH y ROS, que inhiben la corriente de K⁺ e inducen la despolarización celular provocando la entrada de Ca²⁺ extracelular, a través de canales voltaje dependientes, y la secreción de neurotransmisores.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Adachi, T., Ishikawa, K., Hida, W., Matsumoto, H., Masuda, T., Date, F., Ogawa, K., Takeda, K., Furuyama, K., Zhang, Y., *et al.* (2004). Hypoxemia and blunted hypoxic ventilatory responses in mice lacking heme oxygenase-2. *Biochem Biophys Res Commun* 320, 514-522.
- Archer, S.L., Weir, E.K., and Wilkins, M.R. (2010). Basic science of pulmonary arterial hypertension for clinicians: new concepts and experimental therapies. *Circulation* 121, 2045-2066.
- Arias-Stella, J., and Valcarcel, J. (1976). Chief cell hyperplasia in the human carotid body at high altitudes; physiologic and pathologic significance. *Hum Pathol* 7, 361-373.
- Babior, B.M. (1999). NADPH oxidase: an update. *Blood* 93, 1464-1476.
- Babot, M., Birch, A., Labarbuta, P., and Galkin, A. (2014). Characterisation of the active/de-active transition of mitochondrial complex I. *Biochim Biophys Acta* 1837, 1083-1092.
- Babot, M., and Galkin, A. (2013). Molecular mechanism and physiological role of active-deactive transition of mitochondrial complex I. *Biochem Soc Trans* 41, 1325-1330.
- Baradaran, R., Berrisford, J.M., Minhas, G.S., and Sazanov, L.A. (2013). Crystal structure of the entire respiratory complex I. *Nature* 494, 443-448.
- Birch-Machin, M.A., and Turnbull, D.M. (2001). Assaying mitochondrial respiratory complex activity in mitochondria isolated from human cells and tissues. *Methods Cell Biol* 65, 97-117.
- Biscoe, T.J., and Stehbens, W.E. (1966). Ultrastructure of the carotid body. *J Cell Biol* 30, 563-578.
- Bishop, T., Talbot, N.P., Turner, P.J., Nicholls, L.G., Pascual, A., Hodson, E.J., Douglas, G., Fielding, J.W., Smith, T.G., Demetriades, M., *et al.* (2013). Carotid body hyperplasia and enhanced ventilatory responses to hypoxia in mice with heterozygous deficiency of PHD2. *J Physiol* 591, 3565-3577.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Buckler, K.J. (1997). A novel oxygen-sensitive potassium current in rat carotid body type I cells. *J Physiol* 498 (Pt 3), 649-662.
- Buckler, K.J. (2012). Effects of exogenous hydrogen sulphide on calcium signalling, background (TASK) K channel activity and mitochondrial function in chemoreceptor cells. *Pflugers Arch* 463, 743-754.

Buckler, K.J., and Turner, P.J. (2013). Oxygen sensitivity of mitochondrial function in rat arterial chemoreceptor cells. *J Physiol* 591, 3549-3563.

Buckler, K.J., and Vaughan-Jones, R.D. (1994). Effects of hypoxia on membrane potential and intracellular calcium in rat neonatal carotid body type I cells. *J Physiol* 476, 423-428.

Buckler, K.J., Williams, B.A., and Honore, E. (2000). An oxygen-, acid- and anaesthetic-sensitive TASK-like background potassium channel in rat arterial chemoreceptor cells. *J Physiol* 525 Pt 1, 135-142.

Bychkov, R., Pieper, K., Ried, C., Milosheva, M., Bychkov, E., Luft, F.C., and Haller, H. (1999). Hydrogen peroxide, potassium currents, and membrane potential in human endothelial cells. *Circulation* 99, 1719-1725.

Carpenter, E., and Peers, C. (2001). A standing Na⁺ conductance in rat carotid body type I cells. *Neuroreport* 12, 1421-1425.

Chandel, N.S. (2010). Mitochondrial regulation of oxygen sensing. *Adv Exp Med Biol* 661, 339-354.

Chandel, N.S. (2014). Mitochondria as signaling organelles. *BMC Biol* 12, 34.

De Burgh Daly, M., Lambertsen, C.J., and Schweitzer, A. (1954). Observations on the volume of blood flow and oxygen utilization of the carotid body in the cat. *J Physiol* 125, 67-89.

de Castro, F. (1926). Sur la structure et l'innervation de la glande intercarotidienne (glomus caroticum) de l'homme et des mammifères, et sur un nouveau système d'innervation autonome du nerf glossopharyngien. *Trab Lab Invest Biol Univ Madrid* 24, 365–432.

de Castro, F. (1928). Sur la structure et l'innervation du sinus carotidien de l'homme et des mammifères: nouveaux faits sur l'innervation et la fonction du glomus caroticum. *Trab Lab Invest Biol Univ Madrid* 25.

de Castro, F. (1940). Nuevas observaciones sobre la inervación de la región carotídea. *Trab Inst Cajal Invest Biol* 32, 297–384.

Diaz-Castro, B., Pintado, C.O., Garcia-Flores, P., Lopez-Barneo, J., and Piruat, J.I. (2012). Differential impairment of catecholaminergic cell maturation and survival by genetic mitochondrial complex II dysfunction. *Mol Cell Biol* 32, 3347-3357.

Drose, S., and Brandt, U. (2012). Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Adv Exp Med Biol* 748, 145-169.

Duchen, M.R., and Biscoe, T.J. (1992a). Mitochondrial function in type I cells isolated from rabbit arterial chemoreceptors. *J Physiol* 450, 13-31.

Duchen, M.R., and Biscoe, T.J. (1992b). Relative mitochondrial membrane potential and $[Ca^{2+}]_i$ in type I cells isolated from the rabbit carotid body. *J Physiol* 450, 33-61.

Duchen, M.R., Caddy, K.W., Kirby, G.C., Patterson, D.L., Ponte, J., and Biscoe, T.J. (1988). Biophysical studies of the cellular elements of the rabbit carotid body. *Neuroscience* 26, 291-311.

Evans, A.M., Mustard, K.J., Wyatt, C.N., Peers, C., Dipp, M., Kumar, P., Kinnear, N.P., and Hardie, D.G. (2005). Does AMP-activated protein kinase couple inhibition of mitochondrial oxidative phosphorylation by hypoxia to calcium signaling in O₂-sensing cells? *J Biol Chem* 280, 41504-41511.

Eyzaguirre, C., and Koyano, H. (1965). Effects of hypoxia, hypercapnia, and pH on the chemoreceptor activity of the carotid body in vitro. *J Physiol* 178, 385-409.

Eyzaguirre, C., and Uchizono, K. (1961). Observations on the fibre content of nerves reaching the carotid body of the cat. *J Physiol* 159, 268-281.

Fernandez-Vizarra, E., Lopez-Perez, M.J., and Enriquez, J.A. (2002). Isolation of biogenetically competent mitochondria from mammalian tissues and cultured cells. *Methods* 26, 292-297.

Fidone, S.J., Gonzalez C. (1986). Initiation and control of chemoreceptor activity in the carotid body. In *Handbook of Physiology, Respiration*, N.C.a.J.G.W. (Eds.), ed. (Washintong, DC.).

Fishman, M.C., Greene, W.L., and Platika, D. (1985). Oxygen chemoreception by carotid body cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 1448-1450.

Fitzgerald, R.S., Shirahata, M., Chang, I., and Kostuk, E. (2009). The impact of hypoxia and low glucose on the release of acetylcholine and ATP from the incubated cat carotid body. *Brain Res* 1270, 39-44.

Franco-Obregon, A., and Lopez-Barneo, J. (1996). Differential oxygen sensitivity of calcium channels in rabbit smooth muscle cells of conduit and resistance pulmonary arteries. *J Physiol* 491 (Pt 2), 511-518.

Fu, X.W., Wang, D., Nurse, C.A., Dinauer, M.C., and Cutz, E. (2000). NADPH oxidase is an O₂ sensor in airway chemoreceptors: evidence from K⁺ current modulation in wild-type and oxidase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4374-4379.

Ganforina, M.D., and Lopez-Barneo, J. (1991). Single K⁺ channels in membrane patches of arterial chemoreceptor cells are modulated by O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 2927-2930.

Ganforina, M.D., and Lopez-Barneo, J. (1992). Potassium channel types in arterial chemoreceptor cells and their selective modulation by oxygen. *J Gen Physiol* 100, 401-426.

Garcia-Fernandez, M., Ortega-Saenz, P., Castellano, A., and Lopez-Barneo, J. (2007). Mechanisms of low-glucose sensitivity in carotid body glomus cells. *Diabetes* 56, 2893-2900.

Hamanaka, R.B., and Chandel, N.S. (2010). Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends Biochem Sci* 35, 505-513.

Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391, 85-100.

Hayashi, S., Tenzen, T., and McMahon, A.P. (2003). Maternal inheritance of Cre activity in a Sox2Cre deleter strain. *Genesis* 37, 51-53.

Hernansanz-Agustin, P., Izquierdo-Alvarez, A., Sanchez-Gomez, F.J., Ramos, E., Villa-Pina, T., Lamas, S., Bogdanova, A., and Martinez-Ruiz, A. (2014). Acute hypoxia produces a superoxide burst in cells. *Free Radic Biol Med* 71, 146-156.

Hescheler, J., Delpiano, M.A., Acker, H., and Pietruschka, F. (1989). Ionic currents on type-I cells of the rabbit carotid body measured by voltage-clamp experiments and the effect of hypoxia. *Brain Res* 486, 79-88.

Heymans, C., Bouckaert, J., and Dautrebande, L. (1930). Sinus carotidien et réflexes respiratoires II. Influences respiratoires réflexes de l'acidose, de l'alcalose, de l'anhydride carbonique, de l'ion hydrogene et de l'anoxémie: sinus carotidiens et e'changes respiratoires dans les poumons et au dela des poumons. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 39, 400-408.

Hirst, J. (2013). Mitochondrial complex I. *Annu Rev Biochem* 82, 551-575.

Hochachka, P.W., Buck, L.T., Doll, C.J., and Land, S.C. (1996). Unifying theory of hypoxia tolerance: molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9493-9498.

Horn, R., and Marty, A. (1988). Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method. *J Gen Physiol* 92, 145-159.

Jiang, X., Rowitch, D.H., Soriano, P., McMahon, A.P., and Sucov, H.M. (2000). Fate of the mammalian cardiac neural crest. *Development* 127, 1607-1616.

Jonz, M.G., and Nurse, C.A. (2012). Peripheral chemoreceptors in air- versus water- breathers. *Adv Exp Med Biol* 758, 19-27.

Kashani-Poor, N., Zwicker, K., Kersch, S., and Brandt, U. (2001). A central functional role for the 49-kDa subunit within the catalytic core of mitochondrial complex I. *J Biol Chem* 276, 24082-24087.

- Kemp, P.J., and Peers, C. (2007). Oxygen sensing by ion channels. *Essays Biochem* 43, 77-90.
- Kikuchi, G., Yoshida, T., and Noguchi, M. (2005). Heme oxygenase and heme degradation. *Biochem Biophys Res Commun* 338, 558-567.
- Kilfoil, P.J., Tipparaju, S.M., Barski, O.A., and Bhatnagar, A. (2013). Regulation of ion channels by pyridine nucleotides. *Circ Res* 112, 721-741.
- Kim, D., Cavanaugh, E.J., Kim, I., and Carroll, J.L. (2009). Heteromeric TASK-1/TASK-3 is the major oxygen-sensitive background K⁺ channel in rat carotid body glomus cells. *J Physiol* 587, 2963-2975.
- Kim, T.Y., Wang, D., Kim, A.K., Lau, E., Lin, A.J., Liem, D.A., Zhang, J., Zong, N.C., Lam, M.P., and Ping, P. (2012). Metabolic labeling reveals proteome dynamics of mouse mitochondria. *Mol Cell Proteomics* 11, 1586-1594.
- Kline, D.D., Peng, Y.J., Manalo, D.J., Semenza, G.L., and Prabhakar, N.R. (2002). Defective carotid body function and impaired ventilatory responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 821-826.
- Kmita, K., and Zickermann, V. (2013). Accessory subunits of mitochondrial complex I. *Biochem Soc Trans* 41, 1272-1279.
- Kruse, S.E., Watt, W.C., Marcinek, D.J., Kapur, R.P., Schenkman, K.A., and Palmiter, R.D. (2008). Mice with mitochondrial complex I deficiency develop a fatal encephalomyopathy. *Cell Metab* 7, 312-320.
- Kummer, W., and Acker, H. (1995). Immunohistochemical demonstration of four subunits of neutrophil NAD(P)H oxidase in type I cells of carotid body. *J Appl Physiol* (1985) 78, 1904-1909.
- Lambert, A.J., and Brand, M.D. (2004). Inhibitors of the quinone-binding site allow rapid superoxide production from mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Biol Chem* 279, 39414-39420.
- Le Douarin, N.M. (1986). Cell line segregation during peripheral nervous system ontogeny. *Science* 231, 1515-1522.
- Li, Y., Zang, Y., Fu, S., Zhang, H., Gao, L., and Li, J. (2012). H₂S relaxes vas deferens smooth muscle by modulating the large conductance Ca²⁺-activated K⁺ (BKCa) channels via a redox mechanism. *J Sex Med* 9, 2806-2813.
- Lin, M.T., and Beal, M.F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443, 787-795.
- Lindeberg, J., Usoskin, D., Bengtsson, H., Gustafsson, A., Kylberg, A., Soderstrom, S., and Ebendal, T. (2004). Transgenic expression of Cre recombinase from the tyrosine hydroxylase locus. *Genesis* 40, 67-73.

- Linley, J.E. (2013). Perforated whole-cell patch-clamp recording. *Methods Mol Biol* 998, 149-157.
- Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R., and Wang, X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86, 147-157.
- Liu, Y., Fiskum, G., and Schubert, D. (2002). Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem* 80, 780-787.
- Livermore, S., Piskuric, N.A., Buttigieg, J., Zhang, M., and Nurse, C.A. (2011). Low glucose sensitivity and polymodal chemosensing in neonatal rat adrenomedullary chromaffin cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 301, C1104-1115.
- Lopez-Barneo, J. (2003). Oxygen and glucose sensing by carotid body glomus cells. *Curr Opin Neurobiol* 13, 493-499.
- Lopez-Barneo, J., Lopez-Lopez, J.R., Urena, J., and Gonzalez, C. (1988). Chemotransduction in the carotid body: K⁺ current modulated by PO₂ in type I chemoreceptor cells. *Science* 241, 580-582.
- Lopez-Barneo, J., Ortega-Saenz, P., Pardal, R., Pascual, A., and Piruat, J.I. (2008). Carotid body oxygen sensing. *Eur Respir J* 32, 1386-1398.
- Lopez-Barneo, J., Ortega-Saenz, P., Pardal, R., Pascual, A., Piruat, J.I., Duran, R., and Gomez-Diaz, R. (2009). Oxygen sensing in the carotid body. *Ann N Y Acad Sci* 1177, 119-131.
- Lopez-Barneo, J., Pardal, R., and Ortega-Saenz, P. (2001). Cellular mechanism of oxygen sensing. *Annu Rev Physiol* 63, 259-287.
- Lopez-Lopez, J., Gonzalez, C., Urena, J., and Lopez-Barneo, J. (1989). Low pO₂ selectively inhibits K channel activity in chemoreceptor cells of the mammalian carotid body. *J Gen Physiol* 93, 1001-1015.
- Lopez-Lopez, J.R., Gonzalez, C., and Perez-Garcia, M.T. (1997). Properties of ionic currents from isolated adult rat carotid body chemoreceptor cells: effect of hypoxia. *J Physiol* 499 (Pt 2), 429-441.
- Lopez-Lopez, J.R., Perez-Garcia, M.T., Sanz-Alfayate, G., Obeso, A., and Gonzalez, C. (2003). Functional identification of K α subunits contributing to the O₂-sensitive K⁺ current in rabbit carotid body chemoreceptor cells. *Adv Exp Med Biol* 536, 33-39.
- Lopez-Lopez, S., Prossmiti, R., and Garcia-Vela, A. (2007). Nonadiabatic photodissociation dynamics in (HI)₂ induced by intracuster collisions. *J Chem Phys* 126, 161102.

- Macias, D., Fernandez-Aguera, M.C., Bonilla-Henao, V., and Lopez-Barneo, J. (2014). Deletion of the von Hippel-Lindau gene causes sympathoadrenal cell death and impairs chemoreceptor-mediated adaptation to hypoxia. *EMBO Mol Med* 6, 1577-1592.
- McGregor, K.H., Gil, J., and Lahiri, S. (1984). A morphometric study of the carotid body in chronically hypoxic rats. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 57, 1430-1438.
- Michelakis, E.D., Thebaud, B., Weir, E.K., and Archer, S.L. (2004). Hypoxic pulmonary vasoconstriction: redox regulation of O₂-sensitive K⁺ channels by a mitochondrial O₂-sensor in resistance artery smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* 37, 1119-1136.
- Mills, E., and Jobsis, F.F. (1970). Simultaneous measurement of cytochrome a₃ reduction and chemoreceptor afferent activity in the carotid body. *Nature* 225, 1147-1149.
- Mimaki, M., Wang, X., McKenzie, M., Thorburn, D.R., and Ryan, M.T. (2012). Understanding mitochondrial complex I assembly in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1817, 851-862.
- Minguez-Castellanos, A., Escamilla-Sevilla, F., Hotton, G.R., Toledo-Aral, J.J., Ortega-Moreno, A., Mendez-Ferrer, S., Martin-Linares, J.M., Katati, M.J., Mir, P., Villadiego, J., *et al.* (2007). Carotid body autotransplantation in Parkinson disease: a clinical and positron emission tomography study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 78, 825-831.
- Montoro, R.J., Urena, J., Fernandez-Chacon, R., Alvarez de Toledo, G., and Lopez-Barneo, J. (1996). Oxygen sensing by ion channels and chemotransduction in single glomus cells. *J Gen Physiol* 107, 133-143.
- Munoz-Cabello, A.M., Toledo-Aral, J.J., Lopez-Barneo, J., and Echevarria, M. (2005). Rat adrenal chromaffin cells are neonatal CO₂ sensors. *J Neurosci* 25, 6631-6640.
- Murphy, M.P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 417, 1-13.
- Nurse, C.A., Buttigieg, J., Brown, S., and Holloway, A.C. (2009). Regulation of oxygen sensitivity in adrenal chromaffin cells. *Ann N Y Acad Sci* 1177, 132-139.
- Nurse, C.A., Buttigieg, J., Thompson, R., Zhang, M., and Cutz, E. (2006). Oxygen sensing in neuroepithelial and adrenal chromaffin cells. *Novartis Found Symp* 272, 106-114; discussion 114-108, 131-140.
- Nurse, C.A., and Piskuric, N.A. (2013). Signal processing at mammalian carotid body chemoreceptors. *Semin Cell Dev Biol* 24, 22-30.

O'Kelly, I., Stephens, R.H., Peers, C., and Kemp, P.J. (1999). Potential identification of the O₂-sensitive K⁺ current in a human neuroepithelial body-derived cell line. *Am J Physiol* 276, L96-L104.

Ortega-Saenz, P., Levitsky, K.L., Marcos-Almaraz, M.T., Bonilla-Henao, V., Pascual, A., and Lopez-Barneo, J. (2010). Carotid body chemosensory responses in mice deficient of TASK channels. *J Gen Physiol* 135, 379-392.

Ortega-Saenz, P., Pardal, R., Garcia-Fernandez, M., and Lopez-Barneo, J. (2003). Rotenone selectively occludes sensitivity to hypoxia in rat carotid body glomus cells. *J Physiol* 548, 789-800.

Ortega-Saenz, P., Pardal, R., Levitsky, K., Villadiego, J., Munoz-Manchado, A.B., Duran, R., Bonilla-Henao, V., Arias-Mayenco, I., Sobrino, V., Ordonez, A., *et al.* (2013). Cellular properties and chemosensory responses of the human carotid body. *J Physiol* 591, 6157-6173.

Ortega-Saenz, P., Pascual, A., Gomez-Diaz, R., and Lopez-Barneo, J. (2006). Acute oxygen sensing in heme oxygenase-2 null mice. *J Gen Physiol* 128, 405-411.

Ortega-Saenz, P., Pascual, A., Piruat, J.I., and Lopez-Barneo, J. (2007). Mechanisms of acute oxygen sensing by the carotid body: lessons from genetically modified animals. *Respir Physiol Neurobiol* 157, 140-147.

Papreck, J.R., Martin, E.A., Lazzarini, P., Kang, D., and Kim, D. (2012). Modulation of K2P3.1 (TASK-1), K2P9.1 (TASK-3), and TASK-1/3 heteromer by reactive oxygen species. *Pflugers Arch* 464, 471-480.

Pardal, R., and Lopez-Barneo, J. (2002). Carotid body thin slices: responses of glomus cells to hypoxia and K(+) -channel blockers. *Respir Physiol Neurobiol* 132, 69-79.

Pardal, R., Ludewig, U., Garcia-Hirschfeld, J., and Lopez-Barneo, J. (2000). Secretory responses of intact glomus cells in thin slices of rat carotid body to hypoxia and tetraethylammonium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2361-2366.

Pardal, R., Ortega-Saenz, P., Duran, R., and Lopez-Barneo, J. (2007). Glia-like stem cells sustain physiologic neurogenesis in the adult mammalian carotid body. *Cell* 131, 364-377.

Patel, A.J., and Honore, E. (2001). Molecular physiology of oxygen-sensitive potassium channels. *Eur Respir J* 18, 221-227.

Peers, C. (1990a). Effect of lowered extracellular pH on Ca²⁺(+)-dependent K⁺ currents in type I cells from the neonatal rat carotid body. *J Physiol* 422, 381-395.

Peers, C. (1990b). Hypoxic suppression of K⁺ currents in type I carotid body cells: selective effect on the Ca²⁺(+)-activated K⁺ current. *Neurosci Lett* 119, 253-256.

Peers, C., Wyatt, C.N., and Evans, A.M. (2010). Mechanisms for acute oxygen sensing in the carotid body. *Respir Physiol Neurobiol* 174, 292-298.

Peng, Y.J., Nanduri, J., Raghuraman, G., Souvannakitti, D., Gadalla, M.M., Kumar, G.K., Snyder, S.H., and Prabhakar, N.R. (2010). H₂S mediates O₂ sensing in the carotid body. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 10719-10724.

Perez-Garcia, M.T., Colinas, O., Miguel-Velado, E., Moreno-Dominguez, A., and Lopez-Lopez, J.R. (2004). Characterization of the Kv channels of mouse carotid body chemoreceptor cells and their role in oxygen sensing. *J Physiol* 557, 457-471.

Piruat, J.I., Pintado, C.O., Ortega-Saenz, P., Roche, M., and Lopez-Barneo, J. (2004). The mitochondrial SDHD gene is required for early embryogenesis, and its partial deficiency results in persistent carotid body glomus cell activation with full responsiveness to hypoxia. *Mol Cell Biol* 24, 10933-10940.

Platero-Luengo, A., Gonzalez-Granero, S., Duran, R., Diaz-Castro, B., Piruat, J.I., Garcia-Verdugo, J.M., Pardal, R., and Lopez-Barneo, J. (2014). An O₂-sensitive glomus cell-stem cell synapse induces carotid body growth in chronic hypoxia. *Cell* 156, 291-303.

Post, J.M., Hume, J.R., Archer, S.L., and Weir, E.K. (1992). Direct role for potassium channel inhibition in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Physiol* 262, C882-890.

Prabhakar, N.R., and Peers, C. (2014). Gasotransmitter regulation of ion channels: a key step in O₂ sensing by the carotid body. *Physiology (Bethesda)* 29, 49-57.

Ratcliffe, P.J. (2013). Oxygen sensing and hypoxia signalling pathways in animals: the implications of physiology for cancer. *J Physiol* 591, 2027-2042.

Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A., and Mammucari, C. (2012). Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 566-578.

Rodriguez, C.I., Buchholz, F., Galloway, J., Sequerra, R., Kasper, J., Ayala, R., Stewart, A.F., and Dymecki, S.M. (2000). High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. *Nat Genet* 25, 139-140.

Romero-Ruiz, A., Bautista, L., Navarro, V., Heras-Garvin, A., March-Diaz, R., Castellano, A., Gomez-Diaz, R., Castro, M.J., Berra, E., Lopez-Barneo, J., *et al.* (2012). Prolyl hydroxylase-dependent modulation of eukaryotic elongation factor 2 activity and protein translation under acute hypoxia. *J Biol Chem* 287, 9651-9658.

Roy, A., Rozanov, C., Mokashi, A., Daudu, P., Al-mehdi, A.B., Shams, H., and Lahiri, S. (2000). Mice lacking in gp91 phox subunit of NAD(P)H oxidase showed glomus cell $[Ca^{2+}]_i$ and respiratory responses to hypoxia. *Brain Res* 872, 188-193.

Sahoo, N., Hoshi, T., and Heinemann, S.H. (2014). Oxidative modulation of voltage-gated potassium channels. *Antioxid Redox Signal* 21, 933-952.

Schlake, T., and Bode, J. (1994). Use of mutated FLP recognition target (FRT) sites for the exchange of expression cassettes at defined chromosomal loci. *Biochemistry* 33, 12746-12751.

Semenza, G.L. (2012). Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* 148, 399-408.

Starlinger, H., and Lubbers, D.W. (1976). Oxygen consumption of the isolated carotid body tissue (cat). *Pflugers Arch* 366, 61-66.

Tello, D., Balsa, E., Acosta-Iborra, B., Fuertes-Yebra, E., Elorza, A., Ordonez, A., Corral-Escariz, M., Soro, I., Lopez-Bernardo, E., Perales-Clemente, E., *et al.* (2011). Induction of the mitochondrial NDUFA4L2 protein by HIF-1 α decreases oxygen consumption by inhibiting Complex I activity. *Cell Metab* 14, 768-779.

Thompson, R.J., Buttigieg, J., Zhang, M., and Nurse, C.A. (2007). A rotenone-sensitive site and H₂O₂ are key components of hypoxia-sensing in neonatal rat adrenomedullary chromaffin cells. *Neuroscience* 145, 130-141.

Thompson, R.J., Farragher, S.M., Cutz, E., and Nurse, C.A. (2002). Developmental regulation of O₂ sensing in neonatal adrenal chromaffin cells from wild-type and NADPH-oxidase-deficient mice. *Pflugers Arch* 444, 539-548.

Thompson, R.J., Jackson, A., and Nurse, C.A. (1997). Developmental loss of hypoxic chemosensitivity in rat adrenomedullary chromaffin cells. *J Physiol* 498 (Pt 2), 503-510.

Timmers, H.J., Wieling, W., Karemaker, J.M., and Lenders, J.W. (2003). Denervation of carotid baro- and chemoreceptors in humans. *J Physiol* 553, 3-11.

Tipparaju, S.M., Saxena, N., Liu, S.Q., Kumar, R., and Bhatnagar, A. (2005). Differential regulation of voltage-gated K⁺ channels by oxidized and reduced pyridine nucleotide coenzymes. *Am J Physiol Cell Physiol* 288, C366-376.

Toledo-Aral, J.J., Mendez-Ferrer, S., Pardal, R., Echevarria, M., and Lopez-Barneo, J. (2003). Trophic restoration of the nigrostriatal dopaminergic pathway in long-term carotid body-grafted parkinsonian rats. *J Neurosci* 23, 141-148.

Urena, J., Fernandez-Chacon, R., Benot, A.R., Alvarez de Toledo, G.A., and Lopez-Barneo, J. (1994). Hypoxia induces voltage-dependent Ca²⁺ entry and

quantal dopamine secretion in carotid body glomus cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10208-10211.

Urena, J., Lopez-Lopez, J., Gonzalez, C., and Lopez-Barneo, J. (1989). Ionic currents in dispersed chemoreceptor cells of the mammalian carotid body. *J Gen Physiol* 93, 979-999.

Valsecchi, F., Monge, C., Forkink, M., de Groof, A.J., Benard, G., Rossignol, R., Swarts, H.G., van Emst-de Vries, S.E., Rodenburg, R.J., Calvaruso, M.A., *et al.* (2012). Metabolic consequences of NDUFS4 gene deletion in immortalized mouse embryonic fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1817, 1925-1936.

Villadiego, J., Mendez-Ferrer, S., Valdes-Sanchez, T., Silos-Santiago, I., Farinas, I., Lopez-Barneo, J., and Toledo-Aral, J.J. (2005). Selective glial cell line-derived neurotrophic factor production in adult dopaminergic carotid body cells in situ and after intrastriatal transplantation. *J Neurosci* 25, 4091-4098.

Votyakova, T.V., and Reynolds, I.J. (2001). DeltaPsi(m)-Dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria. *J Neurochem* 79, 266-277.

Ward, K.R., Tiba, M.H., Ryan, K.L., Filho, I.P., Rickards, C.A., Witten, T., Soller, B.R., Ludwig, D.A., and Convertino, V.A. (2010). Oxygen transport characterization of a human model of progressive hemorrhage. *Resuscitation* 81, 987-993.

Waypa, G.B., Chandel, N.S., and Schumacker, P.T. (2001). Model for hypoxic pulmonary vasoconstriction involving mitochondrial oxygen sensing. *Circ Res* 88, 1259-1266.

Waypa, G.B., Marks, J.D., Guzy, R., Mungai, P.T., Schriewer, J., Dokic, D., and Schumacker, P.T. (2010). Hypoxia triggers subcellular compartmental redox signaling in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 106, 526-535.

Waypa, G.B., Marks, J.D., Guzy, R.D., Mungai, P.T., Schriewer, J.M., Dokic, D., Ball, M.K., and Schumacker, P.T. (2013). Superoxide generated at mitochondrial complex III triggers acute responses to hypoxia in the pulmonary circulation. *Am J Respir Crit Care Med* 187, 424-432.

Weir, E.K., and Archer, S.L. (1995). The mechanism of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction: the tale of two channels. *Faseb J* 9, 183-189.

Weir, E.K., Lopez-Barneo, J., Buckler, K.J., and Archer, S.L. (2005). Acute oxygen-sensing mechanisms. *N Engl J Med* 353, 2042-2055.

Williams, S.E., Wootton, P., Mason, H.S., Bould, J., Iles, D.E., Riccardi, D., Peers, C., and Kemp, P.J. (2004). Hemoxygenase-2 is an oxygen sensor for a calcium-sensitive potassium channel. *Science* 306, 2093-2097.

Wittig, I., Braun, H.P., and Schagger, H. (2006). Blue native PAGE. *Nat Protoc* 1, 418-428.

Wyatt, C.N., and Buckler, K.J. (2004). The effect of mitochondrial inhibitors on membrane currents in isolated neonatal rat carotid body type I cells. *J Physiol* 556, 175-191.

Wyatt, C.N., Wright, C., Bee, D., and Peers, C. (1995). O₂-sensitive K⁺ currents in carotid body chemoreceptor cells from normoxic and chronically hypoxic rats and their roles in hypoxic chemotransduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 295-299.

Zhang, M., Buttigieg, J., and Nurse, C.A. (2007). Neurotransmitter mechanisms mediating low-glucose signalling in cocultures and fresh tissue slices of rat carotid body. *J Physiol* 578, 735-750.